

AUS DER KLINIK UND POLIKLINIK FÜR RADIOLOGIE
KLINIK DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. med. Jens Ricke

Ehemaliger Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

**Experimentelle in vitro Analyse physikalischer Charakteristika von
Drug-Eluting Beads sowie deren Beladungs- und Elutionskinetik**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Michaela Barnikel
aus Bayreuth

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Mitberichterstatter:	PD Dr. med. Enrico De Toni
	Prof. Dr. med. Hans- Joachim Stemmler
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Tobias Wagershauser
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	01.03.2018

Meiner lieben Familie

Inhalt

1. EINLEITUNG	7
1.1. Embolisation	7
1.1.1. Embolisation als therapeutisches Verfahren	7
1.1.2. Embolisationsmaterialien	9
1.2. TACE	10
1.2.1. Was ist TACE?	10
1.2.2. DEB-TACE versus cTACE	12
1.2.3. Einsatzgebiete der TACE	15
2. FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	19
3. MATERIAL UND METHODEN	20
3.1. Kathetertgängigkeit der Embolisationspartikel	20
3.1.1. Herstellung des Simulationskatheters	20
3.1.2. Anfertigung des Maßstabes	22
3.1.3. Auswahl der verwendeten Embolisationspartikel	24
3.1.4. Färbung von EmboCept®- Partikeln mit königsblauer Tinte	29
3.2. Beladung der Embolisationspartikel mit verschiedenen Zytostatika	31
3.2.1. Beladung von DC Beads® 300-500µm	31
3.2.1.1. Vorgang des Beladens von DC Beads® 300-500µm	31
3.2.1.2. Mikroskopie verschiedener Zustände der DC Beads® 300-500µm während des Beladungsvorganges mit Doxorubicin 2mg/ml	36
3.2.1.3. Photometrie zur Ermittlung der aufgenommenen Zytostatikakonzentration	36
3.2.2. Beladung von Embozene Tandem™ 100µm	40
3.2.2.1. Vorgang des Beladens von Embozene Tandem™ 100µm	40
3.2.2.2. Mikroskopie verschiedener Zustände der Embozene Tandem™ 100µm während des Beladungsvorganges mit Epirubicin 25mg/ml	44
3.3. Vergleichende Betrachtung der Elution verschiedener Drug- Eluting Beads bei 37°C in vitro	45
3.3.1. Elution von Doxorubicin – Lösung 2mg/ml und rekonstituiertem Doxorubicin 25mg/ml aus DC Beads® 300-500µm im offenen System	45
3.3.1.1. Verwendetes Material	46
3.3.1.2. Versuchsaufbau und – ablauf	47
3.3.2. Elution von Epirubicin 25mg/ml aus DC Beads® 300-500µm und Embozene Tandem™ 100µm im geschlossenen System	50
3.3.2.1. Verwendetes Material	51
3.3.2.2. Versuchsaufbau und – ablauf	52
3.3.3. Elution von Mitoxantron 2mg/ml aus DC Beads® 300-500µm und Embozene Tandem™ 100µm im offenen System	54
3.3.3.1. Verwendetes Material	55
3.3.3.2. Versuchsaufbau und -ablauf	56

4. ERGEBNISSE	58
4.1. Kathetertgängigkeit der Embolisationspartikel	58
4.1.1. Verhalten der EmboCept®- Partikel bei der in vitro Untersuchung	58
4.1.2. Verhalten von Weichweizengrieß bei der in vitro Untersuchung	59
4.1.3. Verhalten von Contour SE™ Microspheres bei der in vitro Untersuchung	59
4.1.4. Verhalten von Embosphere® Microspheres bei der in vitro Untersuchung	60
4.1.5. Verhalten von Embozene™ Microspheres bei der in vitro Untersuchung	61
4.1.5.1. Embozene™ Microspheres, Nenngröße 400µm	61
4.1.5.2. Embozene™ Microspheres, Nenngröße 500µm	61
4.1.5.3. Embozene™ Microspheres, Nenngröße 1300µm	62
4.1.6. Verhalten von DC Beads®- Partikel bei der in vitro Untersuchung	63
4.1.7. Verhalten von Embozene Tandem™ -Partikel bei der in vitro Untersuchung	63
4.2. Beladung der Embolisationspartikel mit verschiedenen Zytostatika	64
4.2.1. Beladungsergebnisse der DC Beads® 300-500µm	64
4.2.1.1. Morphologische Variabilität der DC Beads® 300-500µm während des Beladungsvorganges mit Doxorubicin 2mg/ml	64
4.2.1.2. Ermittlung einer Zeit-Dosis –Kurve für die Beladung der DC Beads® 300-500µm mit Epirubicin 5mg/ml	65
4.2.1.3. Ermittlung der Ladungskapazität der DC Beads® 300-500µm für Doxorubicin 2mg/ml	66
4.2.2. Beladungsergebnisse der Embozene Tandem™ 100µm	69
4.2.2.1. Morphologische Variabilität der Embozene Tandem™ 100µm während des Beladungsvorganges mit Epirubicin 25mg/ml	69
4.3. Vergleichende Betrachtung der Elution verschiedener Drug-Eluting Beads bei 37°C in vitro	71
4.3.1. Elution von Doxorubicin – Lösung 2mg/ml und rekonstituiertem Doxorubicin 25mg/ml aus DC Beads® 300-500µm im offenen System	71
4.3.1.1. Auswertung der Messergebnisse mit Ermittlung der Elutionskurve	71
4.3.2. Elution von Epirubicin 25mg/ml aus DC Beads® 300-500µm und Embozene Tandem™ 100µm im geschlossenen System	74
4.3.2.1. Auswertung der Messergebnisse mit Ermittlung der Elutionskurve	74
4.3.3. Elution von Mitoxantron 2mg/ml aus DC Beads® 300-500µm und Embozene Tandem™ 100µm im offenen System	78
4.3.3.1. Auswertung der Messergebnisse mit Ermittlung der Elutionskurve	78
5. DISKUSSION	81
6. ZUSAMMENFASSUNG	90
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	92
8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	93
9. TABELLENVERZEICHNIS	95
10. LITERATURVERZEICHNIS	96

11. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	101
---	------------

1. Einleitung

1.1. Embolisation

1.1.1. Embolisation als therapeutisches Verfahren

Bei der Embolisation handelt es sich um ein minimal invasives, endovaskuläres Therapieverfahren der Medizin, welches einen partiellen oder vollständigen Verschluss von arteriellen oder venösen Gefäßen zum Ziel hat.

Vorwiegendes Einsatzgebiet der arteriellen Embolisation stellen Tumorthapien, arterio-venöse Shunts und Blutungen dar.

Die Milz ist das am häufigsten betroffene Organ bei stumpfen Bauchtraumata, sowohl bei Erwachsenen, als auch bei Kindern [2]. Im nicht operativen Management hämodynamisch stabiler Patienten hat sich neben der einfachen Beobachtung auch die Embolisation der Milzarterie etabliert. Sie hat selbst bei hochgradigen Organverletzungen Erfolgsraten von mehr als 80% [3]. Tsang et al. berichten außerdem von der erfolgreichen Anwendung superselektiver Embolisation mit Coils in der Therapie eines Pseudoaneurysmas der Milzarterie [4]. Siablis et al. veröffentlichen einen Case Report über die erfolgreiche Coil- Embolisation bei einer Patientin mit einem Aneurysma der Milzarterie, das über eine Fistel Kontakt zur Milzvene hatte [5].

Auch eine traumatisch bedingte, akute arteriovenöse Fistel der Nierengefäße kann durch selektive arterielle Embolisation behandelt werden [6] . Dinkel et al. bestätigen den Nutzen der superselektiven Embolisation zur Behandlung von Blutungen der Nierengefäße. Sie stillen Blutungen durch renovaskulären Verletzungen nach stumpfen Traumata mit PVA (Polyvinylalkohol)-Partikel und Coils [7]. Die Embolisation der Nierenarterie spielt auch in der palliativen Therapie von Patienten mit inoperablem Nierenzellkarzinom eine Rolle. So können lokale Symptome gelindert, der klinische Status verbessert und die Zeit des Krankenhausaufenthaltes verringert werden [8].

Die Coil-Embolisation erweist sich auch in Behandlung von tiefen gastrointestinalen Blutungen als sichere und effektive Therapieoption [9]. Dies bestätigt eine von Wang et al. veröffentlichte Studie, in der Patienten mit akuter gastrointestinaler Blutung verschiedener Lokalisationen mit PVA-Partikeln, Gelfoam und Coils embolisiert werden und somit die Blutung gestillt werden

kann [10]. Auch arterielle Blutungen nach stumpfen Lebertrauma bilden ein mögliches Indikationsspektrum [11].

In der Gynäkologie findet die Embolisation ihren Einsatz als therapeutische Maßnahme bei Uterusmyomen und gilt als sichere und effektive Behandlungsoption [12].

Außerdem wird von transarterieller Embolisation primärer und sekundärer Tumoren des Skelettsystems berichtet [13, 14], ebenso wie vom Einsatz der Embolisation in der Behandlung lebensbedrohlicher Hämoptysen mit einem flüssigen Medium, bestehend aus N-Butyl-2-Cyanoacrylat (Histoacryl® Gewebekleber) [15].

Im Gebiet der Neuroradiologie stellt endovaskuläres Coiling aufgrund des geringen operativen Traumas vor allem für ältere Patienten eine vielsprechende Alternative zum operativen Clipping von Aneurysmen dar [16].

Die transarterielle Chemoembolisation als Modifikation der reinen Embolisation findet Anwendung in der onkologischen Therapie diverser Tumorentitäten. Eine weitere Behandlungsoption für dieses Patientengut stellt die ebenfalls transarteriell durchgeführte Selektive Interne Radiotherapie (SIRT) dar.

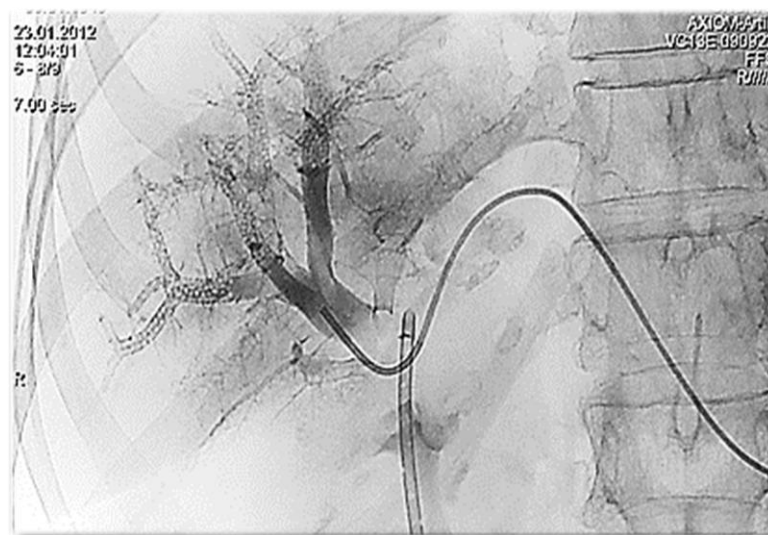


Abbildung 1: Portalvenöse Embolisation des rechten Leberlappens. Klinikum Großhadern, 2012

1.1.2. Embolisationsmaterialien

Die folgende Aufstellung gibt einen Überblick über die gebräuchlichen Materialien zur Embolisation:

- Flüssige Embolisate
 - Histoacryl® Gewebekleber aus n- Butyl-2-Cyanoacrylat (Braun®)
 - Lipiodol® Ultra- Fluid Injektionslösung (Guerbet GmbH)
 - Onyx® Liquid Embolic System (ev3™ The Endovascular Company)
- Partikuläre Embolisate
 - Klassische Partikel
 - Polyvinylalkohol – Partikel (Ivalon® Surgical)
 - Gelfoam® Plus Hemostasis Kit (Baxter)
 - EmboCept® S 45mmg/7,5ml Degradable Starch Microspheres (PharmaCept)
 - Verformbare Partikel
 - Bead Block™, 100-1200 µm (Terumo, Biocompatibles)
 - Embozene® Microspheres (Celo®Nova BioSciences,Inc.)
 - Beladbare Partikel
 - DC Beads®, 100-700µm (Terumo, Biocompatibles)
 - Embozene Tandem™ 100µm, (Celo®Nova BioSciences,Inc.)
 - HepaSphere® Microspheres (Merit Medical Systems Inc.)
 - Life Pearl® Microspheres (Terumo, Biocompatibles)
 - QuadraSphere®Microspheres (Merit Medical Systems Inc.)
- Metallische Embolisate
 - Axium™ Detachable Coil System (ev3™ The Endovascular Company)
 - Azur® Peripheral Hydrocoil (Terumo, Biocompatibles)

1.2. TACE

1.2.1. Was ist TACE?

TACE ist das Akronym für Trans- Arterial Chemo- Embolization. Neben einer selektiven arteriellen Embolisierung des tumorversorgenden Blutgefäßes beinhaltet sie die lokale Abgabe von Zytostatika [17]. Die TACE stellt eine Form der intraarteriellen, kathetergestützten Chemotherapie dar, welche hohe Dosierungen von Zytostatika selektiv ins Tumorgewebe bringt, kombiniert mit dem Effekt der ischämischen Nekrose durch die arterielle Embolisierung [18]. Die TACE hat eine weit verbreitete Anwendung in der lokoregionalen Therapie von Patienten mit nicht resezierbaren primären oder sekundären Lebermalignomen gefunden [19].

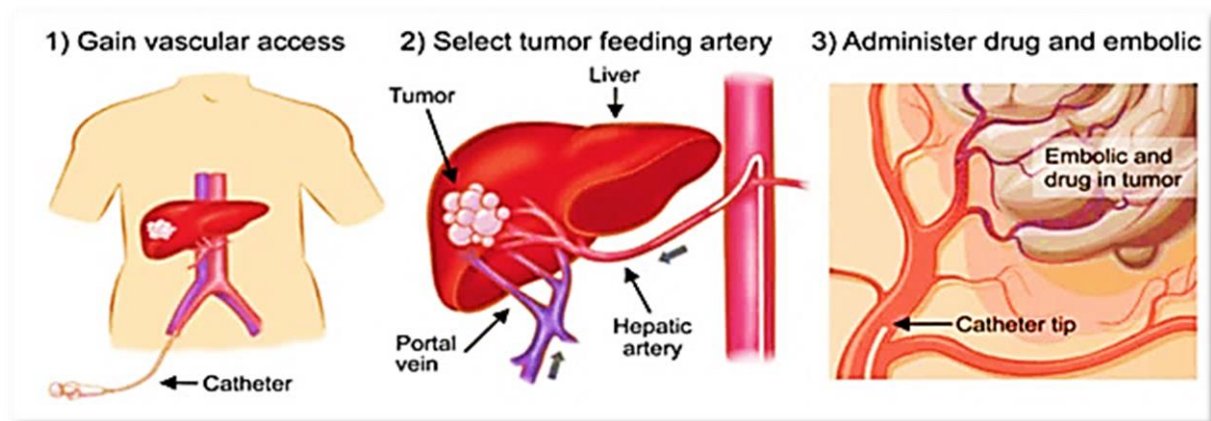


Abbildung 2: Schematische Darstellung der TACE [20]

Es sollten folgende interventionelle Verfahren unterschieden werden: Die reine transarterielle Embolisierung (TAE), bei der kein Chemotherapeutikum gegeben wird, die transarterielle Chemotherapie (TAC), auch Hepatic Artery Infusion (HAI) genannt, bei der das Zytostatikum ohne Lipiodol oder Embolisationspartikel verabreicht wird [18], die konventionelle TACE (cTACE) mit einer Emulsion aus Zytostatikum und Lipiodol [21] und die Drug- Eluting Bead (DEB)-TACE bei der Medikamentengabe und Embolisierung als Ein- Schritt- Prozess kombiniert sind [19].

Drug- Eluting Beads stellen polymere Mikrosphären von kalibrierter Größe [22] dar, die mit Zytostatika beladen werden können [23] und sowohl eine kontrollierte und tumorselektive Medikamentenabgabe, als auch eine permanente Embolisierung sicherstellen [24].

Seine Legitimation findet die TACE in der Tatsache, dass hepatische Neoplasien ihre Blutzufuhr bevorzugt aus der Leberarterie beziehen, während der Großteil der nichtkanzerösen Leber über die Pfortader versorgt wird [25].

Ein Nachteil und auch häufig die Limitierung von systemischer Zytostatikagabe ist das ausgeprägte Nebenwirkungsprofil. Die Behandlungseffektivität bei systemischer Chemotherapie wird oft durch die zytotoxischen Nebenwirkungen herabgesetzt und verhindert somit den Einsatz von effektiven Dosierungen [26]. Dieses soll bei der TACE durch ihre lokale, gezielte Gabe des zytotoxischen Medikamentes deutlich geringer ausfallen. In einer Studie mit 190 Patienten (männlich: n= 155, weiblich: n= 35, mittleres Alter 65 Jahre) mit HCC (hepatocellular carcinoma) (Child Pugh A/B, multiple Leberläsionen: n=141, ECOG 0-2 (Eastern Cooperative Oncology Group)) werden hierfür die Patienten mit durchschnittlich 2,4 Interventionen behandelt. 6 und 12 Monate nach TACE werden die Toxizitätsprofile bestimmt, welche nach den CTCAE (Common Terminology Criteria for Adverse Events) in 5 Schweregrade eingeteilt werden und mit entsprechenden Daten systemischer Zytostatikagabe verglichen. Dabei kann ein günstiges Toxizitätsprofil der TACE im Vergleich zu systemischer Chemotherapie gezeigt werden [27].

Bei Patienten mit HCC im mittleren Stadium weisen in randomisierte Studien ein verbessertes Langzeitüberleben bei TACE-Therapie verglichen mit einer Best Supportive Care- Therapie auf [28-30]. Auch eine Metaanalyse von RCTs (randomized controlled trial) zeigt, dass die 2-Jahres Mortalität bei der cTACE signifikant reduziert ist im Vergleich zu nicht- aktiver Behandlung [31]. Eine kürzlich erschienene prospektive, single-center, randomisierte, einfach verblindete Phase II Studie besagt allerdings kein verbessertes Outcome der DEB-TACE gegenüber einer TAE bei Patienten mit HCC [32]. Das Gesamtüberleben wird durch die TACE im Vergleich zu TAE nicht verbessert, jedoch die Zeit bis zum Progress [33]. Während die DEB-TACE große nekrotische Areale im Tumorgebiet verursacht, ruft die Embolisation mit blanden Beads vor allem nicht nekrotische Veränderungen hervor [34].

Insgesamt handelt es sich bei der TACE um ein relativ komplikationsarmes Verfahren. Schwerwiegende Komplikationen treten in 4-7% der Fälle auf und die 30- Tages Mortalität liegt bei rund 1% [35]. Das Postembolisationsyndrom, das sich durch Übelkeit, Erbrechen, abdominellen Schmerz und Fieber auszeichnet tritt in bis zu 90% der Fälle nach der Therapie auf und dauert bis zu 3 Tagen an [35].

1.2.2. DEB-TACE versus cTACE

Die zwei häufig eingesetzten Methoden der transarteriellen Chemoembolisationen sind die klassische lipiodolbasierte TACE (cTACE) und die Drug-Eluting Bead TACE (DEB-TACE).

Die Forschung hat bereits große Bemühungen darauf verwendet, diese beiden Verfahren bezüglich ihrer Charakteristika zu vergleichen:

Die Menge an Zytostatika, welche in den systemischen Kreislauf gelangt, ist bei der DEB-TACE signifikant geringer als bei der cTACE [24]. Dies eröffnet die Möglichkeit, die Zytostatikadosis, welche selektiv den Tumorzellen ausgesetzt ist, zu erhöhen und gleichzeitig die Toxizität zu senken [24]. Der Schaden am normalen Lebergewebe wird dadurch limitiert [36].

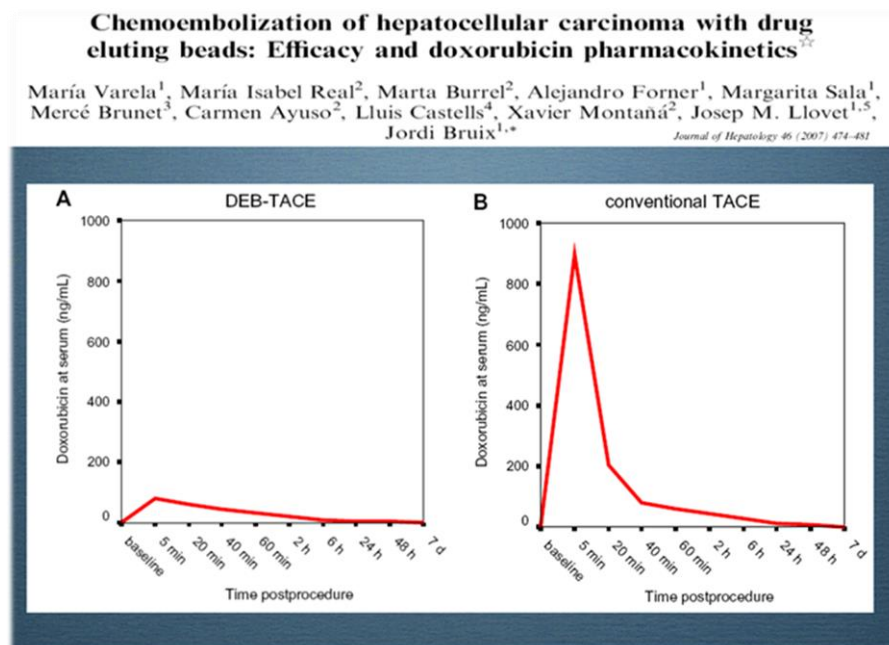


Abbildung 3: Doxorubicinlevel im Serum zu verschiedenen Zeitpunkten bei der DEB-TACE (A) und der cTACE(B) [24]

Kloeckner et al. berichten von ihren Ergebnissen zum Vergleich des Gesamtüberlebens bei Patienten mit HCC, die mit einer cTACE oder DEB-TACE behandelt werden. In einer retrospektiven, single-center Studie werden dafür 250 Patienten eingeschlossen. 174 von ihnen werden einer cTACE (10mg Mitomycin C mit 10ml Lipiodol) unterzogen, 76 einer DEB-TACE (DC Beads® 500-700µm, 300-500µm, 100-300µm mit 150mg Doxorubicin). Die Anzahl der durchgeführten Therapien liegt bei der cTACE bei 4±3.1 Interventionen, bei der DEB-TACE

bei $2.9 \pm 1,8$ Interventionen. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben zwischen cTACE und DEB-TACE bei Patienten mit HCC (cTACE: 409 Tage, DEB-TACE: 369 Tage, $p = 0.76$) [37]. Zu einem anderen Ergebnis kommt eine Metaanalyse über das Outcome von cTACE und DEB-TACE bei Patienten mit nicht resezierbarem HCC. Die 1-, 2-, und 3- Jahres Gesamtüberlebensraten sind für die DEB-TACE signifikant höher als für die cTACE ($p=0.007$, $p=0.02$, $p=0.04$). Auch das 1- und 2- Jahres rezidivfreie Überleben ist in der DEB-TACE Gruppe signifikant höher ($p=0.03$, $p=0.005$) [38]. Laut den Erforschungen von Facciorusso et al. verbessert die DEB-TACE das Überleben jedoch nicht im Vergleich zur cTACE [39].

In der von Arabi et al. veröffentlichten retrospektiven Studie zum Vergleich der Effektivität und des Sicherheitsprofils von DEB-TACE ($n=35$) und cTACE ($n= 19$) in der Behandlung von Patienten mit nicht resezierbarem HCC zeigen sich folgende Ergebnisse: Die DEB-TACE weist im Vergleich zur cTACE eine signifikant geringere Lebertoxizität auf (durchschnittliche Änderung der Alaninaminotransferase 7.2 Units bei der DEB-TACE versus 79.4 Units bei der cTACE, $p =0.001$) und ist mit signifikant kürzeren Krankenhausaufenthalten (7.8 Tage bei DEB-TACE versus 11.4 Tage bei cTACE, $p=0.038$) assoziiert [40]. Im Gegensatz dazu berichten Guiu et al. von einem 6-fach erhöhten Risiko für Leber- und Gallenverletzungen (dilatierte Gallengänge, Verengung eines Pfortaderasts, Pfortaderthrombose und Gallen-/Leberinfarkt) bei einer DEB-TACE verglichen mit cTACE ($OR= 6.63$, $p<0.001$) [41].

Auch Golfieri et al. vergleichen in einer randomisierten Studie die cTACE und die DEB-TACE in Bezug auf die Zeit bis zum Tumorprogress, die Nebenwirkungen und das 2 –Jahres Überleben. In keiner der drei Kategorien zeigt sich eine der Therapien überlegen. Der einzige Vorteil der DEB-TACE scheint das geringere Auftreten von postinterventionellen, abdominalen Schmerzen zu sein ($p< 0.001$) [42].

In der Precision V Studie von Lammer et al. werden ebenfalls cTACE und DEB-TACE verglichen. Es handelt sich um eine randomisierte, multizentrische, prospektive Phase II Studie, in der 212 Patienten mit Leberzirrhose und nicht resezierbarem, großem und /oder multinodulärem HCC eingeschlossen sind. Die weitere Patientencharakteristik umfasst folgende Kriterien: Child Pugh A/B, N0, M0, cTACE: $n= 110$, DEB-TACE: $n= 102$, maximal 3 Behandlungen mit Intervallen von 2 Monaten. Als primärer Endpunkt der Effektivität ist das Tumorausprechen nach 6 Monaten in der MRT gemäß den EASL- Kriterien (European Association for the Study of the Liver) definiert. Den primären Endpunkt der Sicherheit stellen die schweren, behandlungsassoziierten Nebenwirkungen innerhalb der ersten 30 Tage nach Intervention dar. Diese Studie weist auf höhere Raten bezüglich der complete response,

objective response und disease control bei der DEB-TACE verglichen mit der cTACE hin. Dieser Unterschied ist allerdings nicht signifikant ($p=0.11$). Dennoch zeigt sich bei Patienten mit Child Pugh B, ECOG 1, bilobulärem Befall und Rezidiverkrankung ein signifikanter Anstieg in der objective response ($p=0.038$) verglichen mit der cTACE. Einen signifikanten Unterschied im primären Endpunkt der Sicherheit gibt es nicht ($p=0.86$). Ein postinterventioneller Anstieg der Leberenzyme Alaninaminotransferase und Aspartataminotransferase ist jedoch in der DEB-TACE Gruppe signifikant geringer als in der cTACE Gruppe ($p<0.001$) [1].

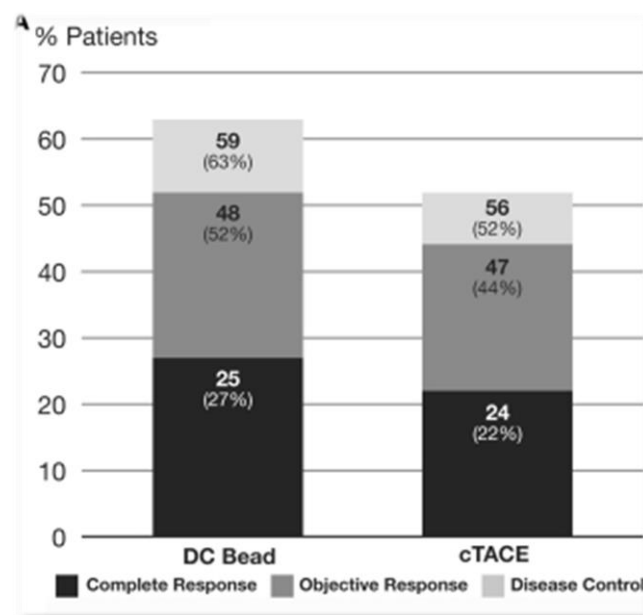


Abbildung 4: Complete response, objective response and disease control rate (cumulative number [%] of patients) aller Patienten nach 6 Monaten. [1]

Alles in allem bleibt zu beachten, dass die fehlende Standardisierung des cTACE-Verfahrens der problematischste Punkt ist, um die Effektivität der cTACE in den verschiedenen Subgruppen des HCC definitiv festzulegen [43]. So ist beispielsweise bekannt, dass die Pharmakokinetik von Doxorubicin bei der cTACE wesentlich von Bestandteilen der Lipidolemulsion und deren Mengenverhältnis zueinander abhängt [44].

1.2.3. Einsatzgebiete der TACE

Die TACE wurde vor über drei Jahrzehnten für die Behandlung von nicht resezierbarem HCC eingeführt [45]. Mittlerweile findet sie nicht nur Anwendung bei Patienten mit nicht resezierbaren Primärtumoren der Leber (HCC und CCC (cholangiocellular carcinoma)), sondern auch bei Lebermetastasen, vor allem eines CRC (colorectal cancer) [46, 47]. Die Bedeutung dieser Therapieform für Patienten mit CRC wird deutlich, wenn man beachtet, dass circa 35% dieser Patienten bereits bei Diagnosestellung Metastasen aufweisen [48]. Bei weiteren bis zu 25% der initial in kurativer Intention behandelten lokalisierten Stadien kommt es im späteren Verlauf zum Auftreten von metachronen Metastasen [49]. Insgesamt entwickeln über die Hälfte aller Patienten mit CRC im Laufe der Erkrankung Lebermetastasen [50]. Hier kommt vor allem DEBIRI (Irinotecan loaded Drug-Eluting Beads) zum Einsatz und gilt als sichere Behandlungsmöglichkeit in der Therapie eines metastasierten CRC [51]. Im Weiteren wird die TACE auch in der Behandlung von neuroendokrinen Tumoren und Brustkrebs eingesetzt [52, 53].

Im Folgenden wird der Fokus auf die TACE in der Therapie des HCC gelegt werden:

Das HCC ist global die fünfthäufigste Tumorerkrankung und die dritthäufigste zum Tode führende Krebsart [54, 55]. Schätzungsweise 748.300 neue Fälle von Leberkrebs und 695.900 Leberkrebstote traten 2008 weltweit auf [56]. In 80-90% der Fälle liegt eine Leberzirrhose vor und stellt damit den größten Risikofaktor für die Malignomentwicklung dar [57]. Ungefähr 1-8% der Patienten mit Zirrhose entwickelt pro Jahr ein HCC [58]. Die Überlebensraten nach Diagnosestellung eines HCC schwanken je nach Tumorstadium stark. Wird ein HCC erst nach Auftreten von Symptomen diagnostiziert, liegt die 5- Jahres-Überlebensrate bei nur 0-10% [59]. Im Gegensatz dazu lassen sich bei Patienten mit einer HCC- Diagnose, die im Rahmen von Früherkennungsuntersuchungen gestellt wird, 5-Jahres-Überlebensraten von über 50% erreichen [60].

Über die Jahre haben sich mehrere Klassifikationssysteme zur Einteilung des HCC entwickelt. Das BCLC Staging System (Barcelona Clinic Liver Cancer) gilt als Referenz der Klassifikationssysteme für das HCC in westlichen Ländern [61]. Es verbindet Staging und Therapieverfahren in einem System und liefert einen prognostischen Vorhersagewert der einzelnen Subgruppen [62, 63].

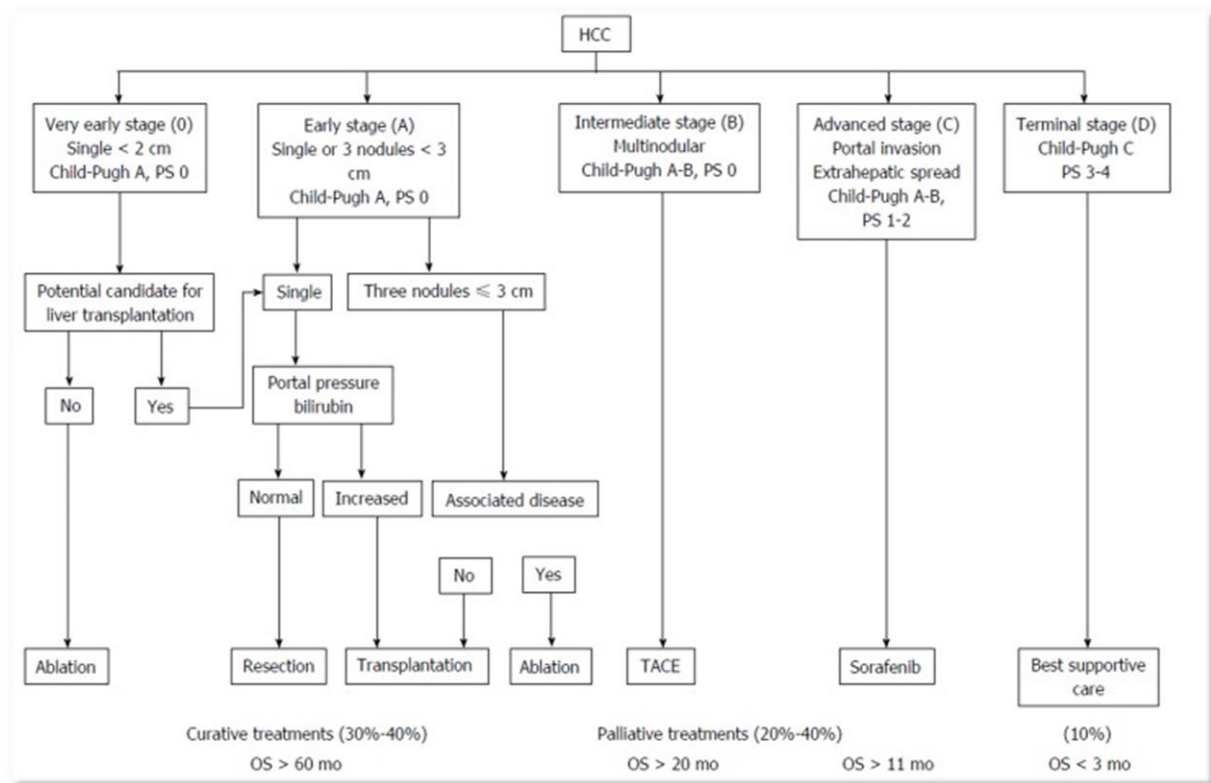


Abbildung 5: BCLC System. HCC: hepatocellular carcinoma, PS: performance status, TACE: transarterielle Chemoembolisation. [61]

Patienten im BCLC Stadium 0 haben einen einzelnen HCC-Herd < 2cm, Child Pugh A und einen Performancestatus von 0. Im BCLC Stadium A sind bis zu drei Herde ≤ 3cm vorhanden, erhaltener Leberfunktion und Child Pugh A-B. Das BCLC Stadium B beinhaltet Patienten mit erhaltener Leberfunktion und großen oder multifokalen, aber asymptomatischen Herden ohne extrahepatische Ausbreitung. Im BCLC Stadium C werden Patienten mit extrahepatischer Tumorausbreitung klassifiziert. Patienten, die sich bereits im BCLC Stadium D befinden, haben eine stark eingeschränkte Leberfunktion und/oder großen physischen Abbau [63].

Die Behandlungsoptionen für das HCC können kategorisiert werden in operative Maßnahmen, bestehend aus Resektion oder Transplantation, und nicht operative Maßnahmen wie eine systemische Chemotherapie oder regionale Verfahren wie die TACE, RFA und Mikrowellenablation [64]. Nur ein operatives Verfahren stellt einen kurativen Ansatz dar, wobei weniger als 20% der Patienten mit diagnostiziertem HCC für eine Operation in Frage kommen [64]. Eine operative Resektion ist die Erstlinientherapie für Patienten mit einzeltem HCC-Herd und ohne klinisch relevante portale Hypertension [63]. Patienten mit portaler Hypertension und/oder multifokalem HCC innerhalb der Milan-Kriterien sollten für eine

Lebertransplantation in Betracht gezogen werden [63]. Sollte eine Lebertransplantation nicht in Frage kommen, kann an eine Ablation gedacht werden. Sie ist hocheffektiv bei einem einzelnen HCC-Herd $\leq 2\text{cm}$ und wird als Erstlinientherapie für diese Patienten angesehen [63]. Als Markierung vor einer Ablation wird oftmals eine TACE durchgeführt.

Die TACE verbessert das Überleben bei Patienten im mittleren Stadium, Sorafenib das der Patienten im fortgeschrittenen Stadium [63].

Die TACE stellt derzeit die Erstlinientherapie bei inoperablem HCC dar [65]. Klassischerweise stellen Patienten mit einem Child Pugh $\leq \text{B7}$ ohne Aszites gemäß den EASL- Kriterien [62] und ohne Gefäßinvasion oder extrahepatischer Ausbreitung [62] die Patientengruppe für eine TACE dar. Das schließt Patienten ein, die für eine kurative Resektion oder Ablation nicht geeignet sind [66]. Obwohl es sich dabei um eine etablierte Therapie handelt, gibt es noch immer Unstimmigkeiten bezüglich der Auswahl des antitumorösen Medikamentes, des Embolisates, der zu verabreichenden Dosis und der Häufigkeit der Behandlung [67]. Weltweit gesehen ist Doxorubicin das populärste Zytostatikum zur Injektion für die TACE.[68]. Sieghart et al. kommen in ihrer Studie zu dem Ergebnis, dass das Fehlen von radiologischem Ansprechen gemäß den EASL- Kriterien und die Verschlechterung der Leberfunktion, definiert als Anstieg der Aspartataminotransferase $> 25\%$ und/oder ein Anstieg im Child Pugh Score, nach der ersten TACE mit einer schlechten Prognose für die Patienten einhergeht, die erneut der TACE unterzogen werden und empfehlen für diese Patientengruppe keine Wiederholung der Behandlung [69].

Therapieziel der TACE ist es, die Progression der Tumorerkrankung zu unterbinden, das progressionsfreie Intervall zu verlängern und die Lebensqualität zu erhalten [70]. Den Ergebnissen einer retrospektiven Studie zufolge ist das mittlere progressfreie Intervall bei Patienten mit HCC im fortgeschrittenen Stadium durch die TACE bei 5.1 Monaten und das Gesamtüberleben dieser Patientenpopulation bei 13.3 Monaten [71].

Weitere Therapieindikationen stellen das Überbrücken des Zeitraums bis zur Lebertransplantation und das Konzept der neoadjuvanten Behandlung dar [70]. Eine 2003 veröffentlichte prospektive Studie mit der Fragestellung, ob eine TACE vor Lebertransplantation einen Tumorprogress vorbeugen kann während die Patienten auf der Warteliste stehen, zeigt vielversprechende Ergebnisse. Die hierfür selektierten Patienten weisen eine einzelne HCC-Läsion $\leq 5\text{cm}$ oder drei Läsionen $\leq 3\text{cm}$ auf. Keiner dieser Patienten musste

aufgrund eines Tumorprogresses von der Warteliste genommen werden, obwohl Raten bis zu 20% ohne präoperative TACE hierfür berichtet werden [72]. Eine andere kürzlich erschienene Studie untersucht die Möglichkeit, die TACE zum Downstaging bei HCC-Patienten für eine bevorstehende Lebertransplantation zu nutzen. Von den eingeschlossenen 60 Patienten sind 23 initial außerhalb der UCSF- Kriterien (University of California, San Francisco) für eine Lebertransplantation. Nach TACE können 17 von ihnen diese Kriterien erfüllen. Das entspricht einer erfolgreichen Downstaging-Rate von 73%. Von den 37 Patienten, welche sich initial bereits für eine Listung zur Transplantation qualifizierten, betragen die 3-, 6-, 12 Monatsraten für das Ausscheiden von der Warteliste mit präoperativer TACE 0%, 3.85% und 16.8%. So können also möglicherweise sowohl bereits gelistete Patienten, als auch Patienten im Rahmen eines Downstagings von der TACE profitieren [73].

Aber nicht für jede Patientengruppe stellt die TACE die geeignete Therapieform dar. Eine RCT untersucht das Gesamtüberleben von 173 Patienten mit resektablem multilokulärem HCC außerhalb der Milan-Kriterien vergleichend nach partieller Hepatektomie und TACE. Die Ergebnislage fällt bezüglich des 1-, 2-, und 3-Jahres Gesamtüberleben zugunsten der partiellen Hepatektomie aus [74]. Auch im Vergleich zu ablativen Verfahren wie der RFA kommt es bei der Chemoembolisation postinterventionell vermehrt zu abdominellen Schmerzen und zu einem stärkeren Anstieg der Alanin- und Aspartataminotransferase [75].

2. Fragestellung und Zielsetzung

Endovaskuläre, minimal-invasive Verfahren wie die Embolisation und Chemoembolisation haben sich in der Behandlung akut und chronisch Kranker etabliert. Die transarterielle Chemoembolisation deckt ein breites Spektrum therapeutischer Indikationen in der Hepatoonkologie ab [68]. Drug – Eluting Beads werden zum Teil für eine signifikante Verbesserung der Technologie gehalten und könnten mit weiterem Fortschritt die Zukunft der Tumorthherapie darstellen [45].

Ziel dieser Arbeit ist es, eine experimentelle in vitro Analyse physikalischer Charakteristika verschiedener partikulärer Embolisate durchzuführen, sowie das pharmakodynamische Profil ausgewählter Drug- Eluting Beads in vitro zu untersuchen.

Ein Hauptaugenmerk liegt auf der morphologischen Variabilität und Elastizität der Partikel. Klinische Relevanz erlangt es durch die Tatsache, dass herkömmlich verwendete Interventionskatheter unter Umständen einen geringeren Innendurchmesser besitzen als die Embolisationspartikel selbst groß sind und somit hohe Anforderungen an elastischen Eigenschaften der Embolisate stellen. Zur Testung der Kathetergängigkeit wird für diese Arbeit ein gläserner Simulationskatheter verwendet.

Des Weiteren werden die mit Zytostatika beladbaren, sphärischen Embolisationspartikel untersucht. Hierfür sollen in vitro Versuche zu deren Beladungskinetik sowie zur Kinetik der Abgabe des Wirkstoffes stattfinden. Neben einer möglichen morphologischen Veränderung der Partikel durch den Beladungsvorgang werden auch die zeitabhängige Beladungsdynamik und die Ladungskapazität einzelner partikulärer Embolisate, sowie deren Elutionsverhalten bei Körpertemperatur erforscht.

3. Material und Methoden

3.1. Kathetergängigkeit der Embolisationspartikel

Um die morphologischen und elastischen Eigenschaften verschiedener partikulärer Embolise in vitro zu erforschen, werden die zu untersuchenden Embolisationspartikel im Mikroskop betrachtet. Dabei ist vor allem die äußere Gestalt der Partikel vor Katheterpassage und deren morphologische Veränderung während und nach dem Durchgang des Katheters von Interesse. Der in der Klinik verwendete Katheter für Embolisierungstherapien am Patienten wird hier durch Herstellung eines Simulationskatheters aus Glas bzw. Kunststoff mit identischem Innendurchmesser imitiert. Zur besseren Vergleichbarkeit werden die mikroskopischen Bilder mit einem Maßstab versehen. Embolise, welche sich im Mikroskop als klare Sphären darstellen, werden zum Teil blau angefärbt, um eine verbesserte Darstellung zu erreichen.

3.1.1. Herstellung des Simulationskatheters

Es gilt, für die in vitro-Experimente einen durchsichtigen Simulationskatheter aus Glas oder Kunststoff zu fertigen, der bezüglich seines Innendurchmessers den Maßen eines klinisch verwendeten Interventionskatheters entspricht. Somit stellt er identische Anforderungen an die elastischen Fähigkeiten der Embolisationspartikel. Der Vorteil des durchsichtigen Simulationskatheters liegt in der Möglichkeit der mikroskopischen Betrachtung einzelner Embolise bei deren Katheterpassage.

Für die Fertigung des verwendeten Simulationskatheters werden folgende Materialien verwendet:

- Glasrohr: Länge 30cm (Schott Rohrglas)
- Kunststoffrohr: Transportschutz eines Dorado® PTA Dilatation Catheter (Bard Medical®)
- Bunsenbrenner

- Draht: Synchro²® STANDARD 0.014 in x 200cm, REF: 2641, LOT: B30905 (Stryker® Neurovascular)
- Histoacryl® Gewebekleber aus n- Butyl-2-Cyanoacrylat (Braun®)
- Zuspritzanschluss: Luer- Lock Combidyn® Adapter (Braun®)
- Discofix® C Dreiwegehahn (Braun®)
- Inflationsgerät: Everest 20 ml-Einweg-Inflator-Pumpe, REF: AC3205P, LOT: 50572691 (Medtronic, Inc.)

Die Glas - und Kunststoffröhrchen werden drehend unmittelbar über der Flamme des Bunsenbrenners erhitzt. Dabei ist auf einen adäquaten Hitzeschutz für die Hände aus nicht flammbarem Material zu achten. Bedingt durch die hohen Temperaturen erweicht das Material binnen kurzer Zeit. Dies ermöglicht die manuelle Extrusion der Röhrchen durch Zug an deren Enden. Dabei soll sich der Durchmesser im mittleren Bereich des Röhrchens auf den Innendurchmesser Null verringern. Durch Aushärtung des Materials bei Raumtemperatur wird die plastische Verformung des Simulationskatheters vervollständigt.

Anschließend wird der Draht eines in vivo verwendeten Interventionskatheters verwendet, um den Zieldurchmesser des Simulationskatheters festzulegen. Der 0.014inch Draht wird in das sich mittig konisch verjüngende Glas-/ Kunststoffröhrchen gefädelt. An der Stelle des größten Widerstandes ist der gesuchte Innendurchmesser erreicht, sodass der Glas-/Kunststoffkatheter an dieser Stelle auseinander gebrochen werden kann. Gläserner Simulationskatheter und in vivo Katheter besitzen nun also identische Innendurchmesser.



Abbildung 6: Simulationskatheterspitze mit Durchmesser 0.014 inch, abgemessen an Synchro²® STANDARD 0.014 in x 200cm

Das hintere Ende des Simulationskatheters wird schließlich mit Hilfe von Histoacryl® Gewebekleber mit einem Luer- Lock Adapter versehen. Auf diese Weise können die Sphären mitsamt ihrer Trägerlösung aus den verschiedenen Behältnissen über einen zwischengeschalteten Dreiwegehahn eingespritzt werden. Bei Partikeln mit sehr großem Durchmesser ist es nötig, mittels Inflationsgerät den entsprechenden Druck aufzubauen, um die Embolisate bis in die Simulationskatheterspitze zu transportieren. Zunächst wird jeweils der native Zustand mikroskopisch erfasst. Die nächste Aufnahme erfolgt während sich die Partikel im Simulationskatheter befinden und dort je nach Größe gegebenenfalls komprimiert werden. Schließlich wird ihre morphologische Struktur nach deren Durchtritt beurteilt. Für den Durchgang des Simulationskatheters werden Embolisationspartikel stets mit der jeweiligen Trägerlösung appliziert.

3.1.2. Anfertigung des Maßstabes

Um eine Orientierung über die Größenverhältnisse der verschiedenen partikulären Embolisate zu schaffen und eine eventuelle Verformung der Selbigen zu quantifizieren, soll ein angelegter Maßstab von Nutzen sein.

Für die Anfertigung eines geeigneten Maßstabes werden folgende Materialien und Computerprogramme verwendet:

- Draht: ev 3™ NITREX™ .018 " x 80 cm, REF: N180802, LOT:10204387 (ev3 Endovascular, Inc.)
- Mikroskopiebilder:
 - o Auflicht - Mikroskop: USB Digital- Handmikroskop 1,3 MP, Art. No. : 88-54000 (Bresser)
 - o Software: Future WinJoe
- PowerPoint: Microsoft Windows 8, Version 6.2 (Build 9200) © Microsoft Corporation
Microsoft PowerPoint 2013 Bestandteil von Microsoft Office Home and Student 2013
- Paint: Microsoft Windows 8, Version 6.2 (Build 9200) © Microsoft Corporation

Zunächst wird der Draht mit Durchmesser 0.018 inch mittels Auflicht-Mikroskop fotografiert und über die Software Future WinJoe auf dem PC gespeichert. Über eine Bearbeitung dieses Bildes mithilfe von PowerPoint gelingt es eine Referenzstrecke anzufertigen, die mit einer

Länge von 6,42 cm den $460\mu\text{m}$ (≈ 0.018 inch) des Drahtdurchmessers entspricht. Ein derartiger Referenzwert ist für die Scharfstellung des Mikroskops sowohl im Nah- als auch im Fernbereich nötig. Davon ausgehend können nun Strecken beliebiger Länge entworfen werden.



Abbildung 7: Draht (ev 3™ NITREX™ .018 '' x 80cm) mit der Referenzgerade der Länge $460\mu\text{m}$

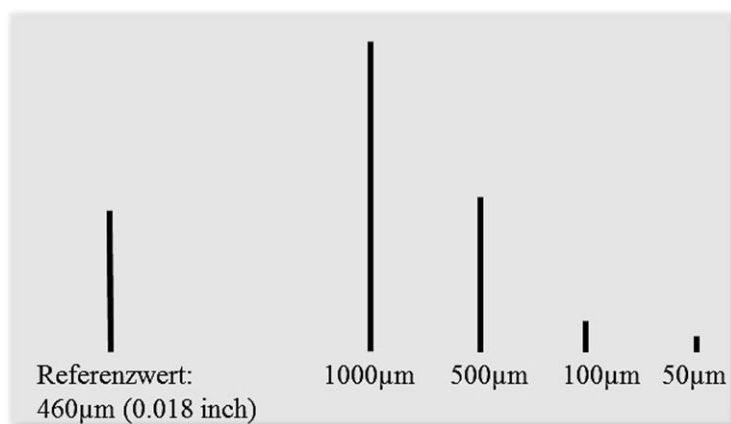


Abbildung 8: Referenzwert des Maßstabes mit Erweiterung auf geläufige Längen

Nach Umrechnung auf geläufige Werte kann die jeweilige Strecke als Maßstab über jedes beliebige Mikroskopiebild gelegt werden, welches auf dieselbe Art angefertigt wird.

Damit im Rahmen der Bildbearbeitung und -formatierung die richtige Relation zwischen Bildgröße und Maßstab stets gewährleistet werden kann, wird aus zwei übereinander gelegten Bildern mittels Paint ein einziges JPEG- Bild generiert.

3.1.3. Auswahl der verwendeten Embolisationspartikel

Um verschiedene Embolisationsmaterialien auf ihre physikalischen Eigenschaften bei der Katheterpassage zu untersuchen, wird eine geeignete Auswahl getroffen. Dabei beschränkt sich die hier betrachtete Zusammenstellung von Embolisationsmaterialien auf partikuläre Embolisate, ohne näher auf flüssige oder metallische Embolisate einzugehen. Zudem wird in Anlehnung an die stärkehaltigen Partikel EmboCept®S Degradable Starch Microspheres ein in der Medizin nicht verwendetes Material betrachtet – stärkehaltiger Weichweizengrieß.

Zu den ausgewählten Embolisationspartikeln gehören:

- EmboCept® S 45mmg/7,5ml Degradable Starch Microspheres (PharmaCept)
- Weichweizengrieß, 500g- Packung (Aviko B.V., Niederlande)
- Contour SE™ Microspheres 300-500µm, REF: 76-120, LOT:6996665 (Boston Scientific Corporation)
- Embosphere® Micorspheres 700-900µm, REF: V810GH, LOT:084GS2 (Merit Medical)
- Embozene™ Microspheres (Celo®Nova BioSciences, Inc.)
 - o Nenngröße: 400µm
 - o Nenngröße: 500µm
 - o Nenngröße: 1300µm
- DC Beads® 300-500µm, REF: DC2V305 (Terumo, Biocompatibles)
- Embozene Tandem™ 100µm, (Celo®Nova BioSciences, Inc.)

Die folgenden Abbildungen zeigen die ausgewählten Embolisate in ihrem nativen Zustand, aufgenommen mit dem Auflicht- Mikroskop und der dazugehörigen Software Future WinJoe. Dabei ist zu beachten, dass die zirkulär angeordneten Lichtreflexe auf den mikroskopischen Bildern als Artefakte zu werten sind, welche die Bildqualität beeinträchtigen. Sie entstehen durch Spiegelung der Auflicht-Beleuchtung in der Trägerlösung der Partikel.

EmboCept®- Partikel

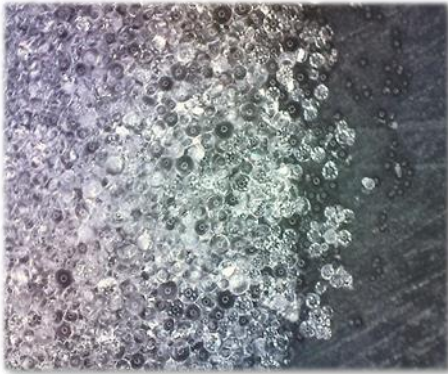


Abbildung 9: EmboCept® S 45mmg/7,5ml
Degradable Starch Microspheres
(PharmaCept)

Die hier nativ dargestellten, stärkehaltigen EmboCept® zeigen sich als homogen runde Partikel mit leicht variierendem Durchmesser. Die Schwankungen belaufen sich dabei auf 50-100µm. Die durchsichtige Oberfläche der EmboCept® erschwert eine exakte Beurteilung der Sphären während der Katheterpassage. Deshalb werden sie nach unten genannter Anleitung blau angefärbt, bevor in den Simulationskatheter gespritzt und mikroskopisch abgebildet werden.

Weichweizengrieß



Abbildung 10: Weichweizengrieß(Aviko B.V.,
Niederlande)

In Anlehnung an die stärkehaltigen EmboCept® wird auch stärkehaltiger Weichweizengrieß mikroskopisch untersucht. Die Körner präsentieren ein heterogenes, polygonales Profil mit einem mittleren Durchmesser von circa 500µm. Im Gegensatz zu den anderen verwendeten Embolisaten fehlt ihnen die Trägerlösung, sodass sie mit Leitungswasser unter Zuhilfenahme eines Inflationsgerätes in den Simulationskatheter gebracht werden.

Contour SE™ Microspheres

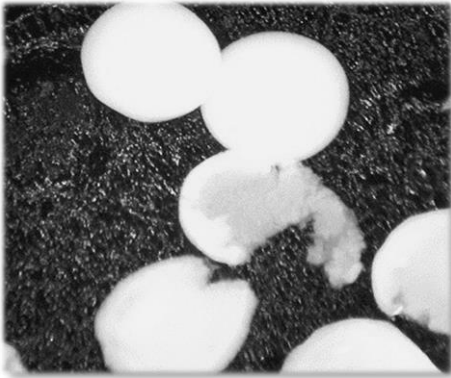


Abbildung 11: Contour SE™ Microspheres, 300-500µm (Boston Scientific Cooperation)

Soweit es sich um intakte Embolisationspartikel handelt, weisen diese eine sphärische Struktur mit Durchmesser 300-500µm auf. Ihr Grundgerüst besteht aus Polyvinylalkohol [35]. Zu beachten ist allerdings, dass einige von ihnen im Nativzustand schon vor Katheterpassage Läsionen ihrer homogenen Morphe aufweisen.

Embosphere® Microspheres

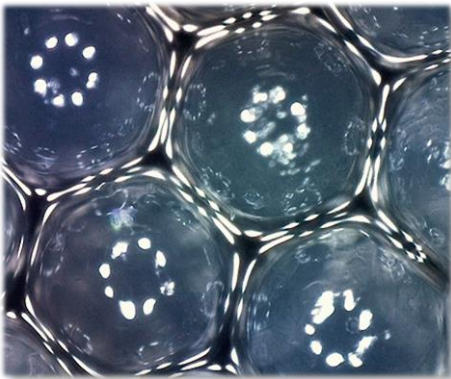


Abbildung 12: Embosphere® Microspheres 700-900µm (Merit Medical)

Die homogen kugeligen Embospheres® Microspheres lassen sich trotz ihres durchsichtigen Erscheinens mikroskopisch gut darstellen und sind auch makroskopisch mit ihrem Durchmesser von 700-900µm deutlich erkennbar. Ein Anfärben der Sphären ist aufgrund ihrer guten Darstellung im nativen Zustand nicht nötig. Das Grundgerüst dieser Sphären besteht aus Trisacryl und Gelatine [18].

Embozene™ Microspheres, Nenngröße 400µm

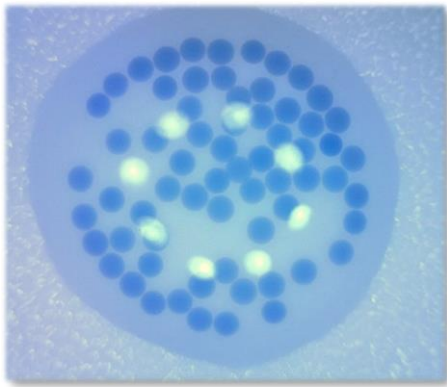


Abbildung 13: Embozene™ Microspheres
400µm (Celo® Nova BioSciences, Inc.)

Die blauen Embozene™ Microspheres Embolisationspartikel mit Durchmesser von 400µm lassen sich dank ihrer Eigenfarbe sehr gut darstellen. Die Designspezifikationen werden für dieses Modell mit 400µm \pm 50µm angegeben. Als empfohlener Innendurchmesser des verwendeten Katheters ist ein 0,013 Zoll (circa 330µm) Katheter aufgelistet. Dies entspricht in etwa dem Durchmesser des verwendeten Simulationskatheters (circa 355µm).

Embozene™ Micorspheres, Nenngröße 500µm

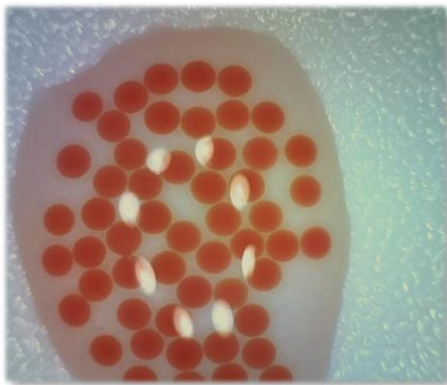


Abbildung 14: Embozene™ Microspheres
500µm (Celo® Nova BioSciences, Inc.)

Analog den anderen Größen dieses Sphärenmodells kommen auch diese Partikel farblich gut zur Geltung. Die Herstellerangaben zu diesen Embozene™ Microspheres besagen eine Designspezifikation von 530µm \pm 50µm und einen empfohlenen Katheter für die Intervention von 0,016 Zoll (circa 400µm). Die den partikulären Bestandteil umgebende Trägerflüssigkeit ist hier gut zu erkennen und wird, wie bei allen anderen Embolisaten, für den in vitro Versuch der Kathetergängigkeit gemeinsam mit den Partikeln in den Simulationskatheter injiziert.

Embozene™ Microspheres, Nenngröße 1300µm

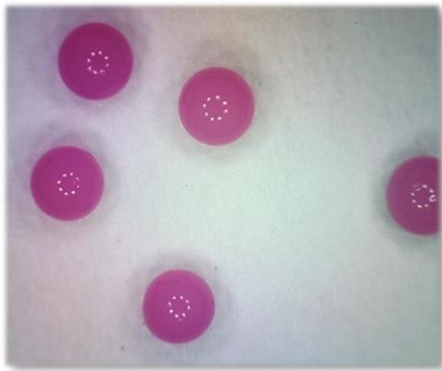


Abbildung 15: Embozene™ Microspheres
1300µm (Celo®Nova BioSciences, Inc.)

Die hier abgebildeten Embolisationspartikel sind mit einem Durchmesser von 1300µm das größte Modell der Embozene™Microspheres. Die Produktangaben belaufen sich auf 1300µm \pm 75 µm und geben ein Mindestdurchmesser des Katheters von 0,038 Zolln (circa 965 µm) an. Aufgrund des ungünstigen Verhältnisses zwischen Innendurchmesser des Simulationskatheters und Partikeldurchmesser ist auch hier ein Infaltionsgerät als Hilfestellung zur Applikation der Embolisate notwendig.

DC Beads®



Abbildung 16: DC Beads® 300-500µm
(Terumo, Biocompatibles)

Die DC Beads® werden im Rahmen der klinischen Intervention der Chemoembolisation mit einem Zytostatikum beladen und bieten somit die Möglichkeit der DEB-TACE. Zur in vitro Testung der Kathetergängigkeit werden allerdings die nativen Partikel betrachtet. Sie weisen eine homogen sphärische Struktur bei einem Durchmesser von 300-500µm auf. Auch ihr Material basiert auf Polyvinylalkohol [76].

Embozene Tandem™

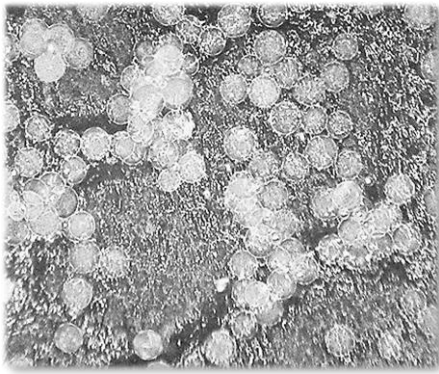


Abbildung 17: Embozene Tandem™ 100µm
(Celo®Nova BioSciences, Inc.)

Die Embozene Tandem™ Embolisationspartikel gehören ebenfalls zur Gruppe der Drug-Eluting Beads. Ihr Durchmesser von circa 100µm und farbloses Erscheinungsbild im nativen Zustand erschweren eine einwandfreie mikroskopische Darstellung.

3.1.4. Färbung von EmboCept®- Partikeln mit königsblauer Tinte

Da sich die EmboCept®- Partikel im Mikroskop als durchsichtige Sphären darstellen, die zudem über einen geringen Durchmesser verfügen, gestaltet sich eine deutliche mikroskopische Darstellung als schwierig, insbesondere im gläsernen Simulationskatheter. Färbt man diese Partikel jedoch mit handelsüblicher königsblauer Tinte, gelingt eine bessere Beurteilung der Morphologie. Für das hier angewendete Verfahren der Färbung wurden diese Materialien verarbeitet:

- Pelikan 4001 TP6, königsblau
- EmboCept® S 45mmg/7,5ml Degradable Starch Microspheres (PharmaCept)
- 2 ml Spritze: Omnifix® Solo (Braun®)
- 20ml Spritze: Omnifix® Solo (Braun®)
- Sterican®Standardkanülen, Art.-No./Ref.:4657519, Pharmacy code: 2050798 (Braun®)
- Intrapur®Lipid 1,2µm Infusionsfilter (Braun®)
- 2 x10ml 0,9%NaCl Miniplasco (Braun®)
- Schere

Aus der Originalampulle der EmboCept®- Partikel wird 1 ml entnommen (Schritt 1). Dieser wird mit wenigen Tropfen der königsblauen Tinte in der Spritze zu einer heterogenen Suspension vermengt (Schritt 1). Anschließend wird die nun blaufarbene Lösung in vorgegebener Richtung auf das Infusionsfilterpapier gespritzt (Schritt 2). Die 2x10ml 0,9%NaCl werden aufgezogen und ebenfalls in vorgegebener Richtung durch den Infusionsfilter gespült, um die überschüssige, nicht an den EmboCept® – Partikeln haftende Tinte zu entfernen, während die 50µm EmboCept®- Partikel auf dem 1,2µm Filterpapier verbleiben (Schritt 3). Für die weitere Verwendung der angefärbten Partikel kann die Plastikhülle des Infusionsfilters mit einer Schere geöffnet werden. Analog der oben beschriebenen Auswahl an Emoblisationspartikeln, werden nun auch die blauen EmboCept® Sphären zur Testung ihrer Kathetergängigkeit mitsamt der Trägerlösung in den gläsernen Simulationskatheter appliziert.

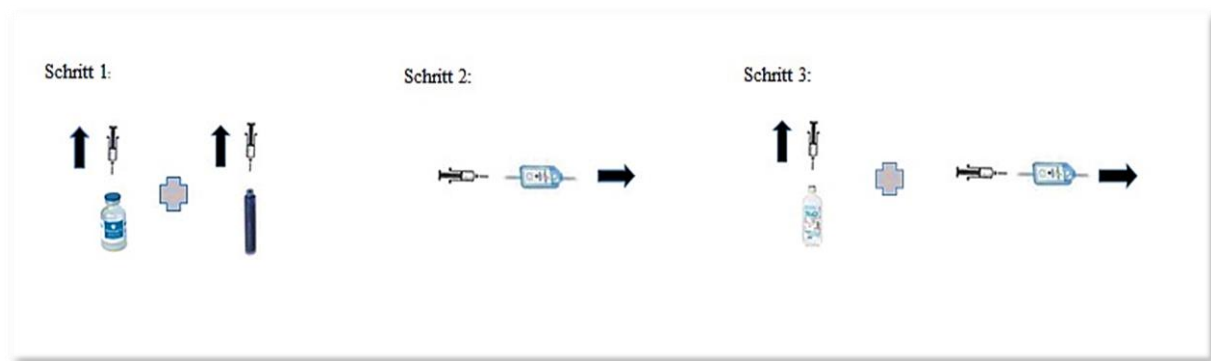


Abbildung 18: Verfahren zur Färbung von EmboCept® mit königsblauer Tinte

3.2. Beladung der Embolisationspartikel mit verschiedenen Zytostatika

Im Rahmen einer TACE mit Drug- Eluting Beads stehen mehrere sphärische Embolisationsmaterialien zur Verfügung. Für die in vitro Experimente zur Beladungskinetik liegt der Schwerpunkt auf den DC Beads® 300-500µm und den Embozene Tandem™ 100µm. Die Anleitungen zur medikamentösen Beladung dieser beiden Partikel stellt dabei die Grundlage der weiteren Versuche dar. Neben der morphologischen Untersuchung beider Drug-Eluting Beads während des Beladungsvorganges wird im Rahmen der kinetischen Testung auch eine Zeit- Dosis- Kurve für die DC Beads® erstellt. Des Weiteren wird unter Zuhilfenahme von Photometrie die von den DC Beads® aufgenommene, und damit potentiell dem Organismus verfügbare Zytostatikakonzentration ermittelt.

3.2.1. Beladung von DC Beads® 300-500µm

3.2.1.1. Vorgang des Beladens von DC Beads® 300-500µm

DC Beads® als sphärische, verformbare Embolisate [57] besitzen die chemische Struktur eines Sulfonat-modifizierten PVA- Polymers [20]. Sie sind in folgenden Größen verfügbar:

- 70- 100µm (DC Bead M1®)
- 100-300µm
- 300-500µm
- 500-700µm [77]

Zur besseren Sichtbarkeit werden die DC Beads® mit einem Farbstoff angefärbt [17]. Vor deren klinischer Anwendung im Rahmen einer DEB-TACE müssen sie mit den geeigneten Zytostatika beladen werden. Zugelassen für die Beladung der DC Beads® sind folgende positiv geladenen Wirkstoffe: Irinotecan aus der Gruppe der Topoisomerase-Hemmer und Doxorubicin aus der Gruppe der Anthrazykline [78]. Letzteres steht sowohl in flüssigem, als auch als Trockensubstanz zur Verfügung. Die Fähigkeit positiv geladene Medikamente aufzunehmen ist die Konsequenz der anionisch geladenen funktionellen Gruppen an den Polymerketten [18]. Die Mikrosphären können so aktiv entgegengesetzt geladene Medikamente über den Mechanismus des Ionenaustausches aufnehmen [36]. Die Verwendung anderer, ebenfalls



Die vollständig polymerisierten Mikrosphären bestehen zu über 90% aus Wasser, welches zwischen den Molekülen eingelagert ist [79]. Durch den Beladungsvorgang von Drug- Eluting Beads verringert sich deren Wassergehalt [83] und die elastischen Fähigkeiten nehmen zu [76].

Für eine korrekte Beladung der DC Beads® mit Doxorubicin 2mg/ml werden diese Materialien benötigt:

- DC Beads® 300-500µm, REF: DC2V305 (Terumo, Biocompatibles)
- Doxorubicinhydrochlorid TEVA® 2mg /ml
- 20ml Spritze: Omnifix® Solo (Braun®)
- Sterican®Standardkanülen, Art.-No./Ref.:4657519, Pharmacy code: 2050798 (Braun®)

Zunächst wird der gesamte Inhalt einer DC Bead®- Glasampulle in eine Spritze aufgezogen (Schritt 1). Anschließend wird der flüssige Überstand, bestehend aus einer Phosphatpufferlösung, aus der Spritze entfernt und verworfen, sodass weitestgehend nur die blauen Mikrosphären übrig bleiben (Schritt 2). Die benötigte Dosis Doxorubicin wird in die DC Bead® tragende Spritze transferiert (Schritt 3) und in diesem Verhältnis inkubiert. Nach Verstreichen der entsprechenden Zeit wird erneut der Überstand der nun roten DC Beads® aus der Spritze entfernt (Schritt 4). Die Embolisate sind nun mit Doxorubicin beladen und können zusammen mit nicht- ionischem Kontrastmittel appliziert werden (Schritt 5).

Loading of DC Bead[®] using Doxorubicin Powder in syringe

Step 1

Take flip cap off DC Bead[®] vial(s) but do not remove metal around the bung. Transfer each vial of DC Bead[®] via an 18-gauge needle or equivalent into a 20-30ml syringe.



POWDER

Step 4

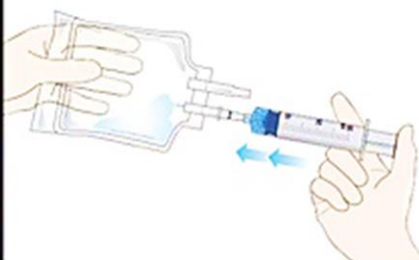
Draw up the required dose of doxorubicin into the syringe containing DC Bead[®]. Gently agitate the mixture occasionally during loading time.



POWDER

Step 2

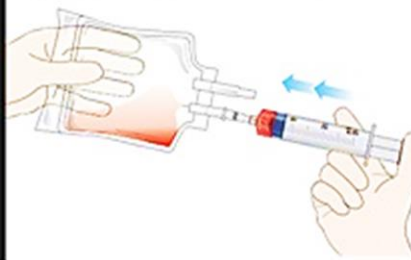
Expel excess packing solution from the syringe. A 5-micron filter needle can help with this process.



POWDER

Step 5

When loading time is complete, expel the excess liquid from the syringe. A 5-micron filter needle can help with this process.



POWDER

Step 3

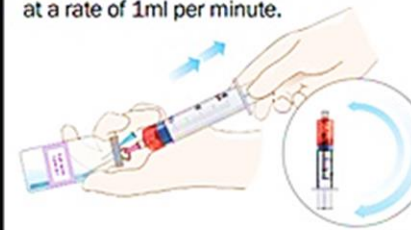
Reconstitute each vial of doxorubicin powder with 2ml of sterile water for injection (NOT sodium chloride). Mix well.



POWDER

Step 6

To prepare the loaded DC Bead[®] for injection, add 5-10ml of non-ionic contrast medium per ml of DC Bead[®] and mix gently to give a good suspension. Inject solution at a rate of 1ml per minute.



POWDER

Biocompatibles
Excellence in Interventional Oncology

Abbildung 21: Loading instructions der DC Beads[®] mit Doxorubicin- Pulver (Terumo, Biocompatibles)

Die für diese Arbeit verwendeten, mit Doxorubicin beladenen DC Beads® werden unter sterilen Bedingungen in der Krankenhausapotheke des Universitätsklinikums Großhadern nach folgender Rechnung hergestellt:

Doxorubicin - Stammlösung: 2 mg/ml

Menge der verwendeten Stammlösung: $3 \times 12,5 \text{ ml} = 37,5 \text{ ml}$

Konzentration der verwendeten Stammlösung für eine DC Bead® - 2ml Ampulle:

$37,5 \text{ ml} \times 2 \text{ mg/ml} = 75 \text{ mg Doxorubicin} / 2 \text{ ml DC Beads®} = 37,5 \text{ mg/ml}$

Vor der Lieferung wird diese Lösung 24 Stunden lang von der Apotheke inkubiert. Laut Herstellerangaben sind 18 Stunden für eine 100%ige Sättigung mit der Doxorubicin- Lösung ausreichend, jedoch ist eine Inkubationszeit von 24 Stunden im klinischen Alltag problemloser händelbar. Unmittelbar vor der Auslieferung aus der Krankenhausapotheke wird die Suspension vom Überstand bis auf 5 ml Flüssigkeit befreit. Die gelieferte Suspension enthält im theoretischen Idealfall also eine Konzentration von 37,5 mg /ml. Lewis et al halten eine Konzentration von 25mg Doxorubicin/ 1ml DC Beads® für eine praktikable Dosierung und ein optimales Handling [76]. Die Doxorubicindosis für eine TACE liegt je nach Zentrum bei 50-150mg, ohne dafür eine evidenzbasierte Rationale zu haben [84].

Hecq et al berichten, dass die Aufbewahrung von steril hergestellten beladenen DC Beads® 14 Tage unter Kühlbedingungen von 2- 8 °C ohne signifikanten Verlust der Doxorubicinkonzentration oder des Doxorubicinreinheitsgrades möglich sei [19]. Dies setzt die strenge Einhaltung sämtlicher hygienischer Vorschriften voraus.

Loading times for up to 50mg or 75mg of doxorubicin per vial of DC Bead*						
Doxorubicin Uptake	100-300µm up to 50mg 75mg per vial per vial		300-500µm up to 50mg 75mg per vial per vial		500-700µm up to 50mg 75mg per vial per vial	
93%	3 hours	4 hours	7 hours	10 hours	8 hours	24 hours
98%	4 hours	5 hours	8 hours	14 hours	10 hours	30 hours
100%	5 hours	7 hours	9 hours	18 hours	11 hours	36 hours
* Tolerance of ±3%						

Tabelle 1: Loading times der DC Beads® für Doxorubicin- Lösung (Terumo, Biocompatibles)

3.2.1.2. Mikroskopie verschiedener Zustände der DC Beads® 300-500µm während des Beladungsvorganges mit Doxorubicin 2mg/ml

Analog der mikroskopischen Betrachtung ausgewählter Embolisationspartikel bei deren Katheterpassage werden an dieser Stelle die DC Beads® erneut mikroskopisch untersucht. Besonderes Augenmerk liegt nun auf der Betrachtung morphologischer Veränderungen durch den Beladungsvorgang mit Doxorubicin. Hier gilt es zu erneut erwähnen, dass es bei der Verwendung des Auflicht-Mikroskops zu reflexbedingten Artefakten der Aufnahmen kommen kann, welche sich als zirkulär angeordnete Punkte darstellen. Die medikamentöse Beladung der DC Beads® wird unter sterilen Bedingungen von der Krankenhausapotheke des Universitätsklinikums Großhadern übernommen und nach der vorgegebenen Inkubationszeit applikationsbereit geliefert.

3.2.1.3. Photometrie zur Ermittlung der aufgenommenen Zytostatikakonzentration

Es gibt die Möglichkeit, DC Beads® mit rekonstituiertem Doxorubicin-Pulver 25mg/ml oder Doxorubicin –Lösung 2mg/ml zum Zwecke der DEB- TACE zu beladen. Da sich die Konzentrationen der verschiedenen Aggregatzustände unterscheiden, variieren die Beladungszeiten für eine 98 % -ige Beladung der Partikel.

Die Beladungszeit der DC Beads® mit 50mg Doxorubicin- Pulver beziehungsweise mit der daraus rekonstituierten Doxorubicin- Lösung 25mg/ml wird vom Hersteller folgendermaßen angegeben:

Loading time for up to 37.5mg of doxorubicin per ml of DC Bead* (75mg per vial)			
Doxorubicin Uptake	100-300µm	300-500µm	500-700µm
90%*	30 minutes	45 minutes	60 minutes
98%*	60 minutes	90 minutes	120 minutes
* Tolerance of ±3%			

Tabelle 2: Loading times der DC Beads® mit Doxorubicin-Pulver (Terumo, Biocompatibles)

Für die Beladung der DC Beads® mit einer Doxorubicin- Lösung 2mg/ml werden folgende Angaben gemacht:

Loading times for up to 50mg or 75mg of doxorubicin per vial of DC Bead*						
Doxorubicin Uptake	100-300µm up to 50mg 75mg per vial per vial		300-500µm up to 50mg 75mg per vial per vial		500-700µm up to 50mg 75mg per vial per vial	
93%	3 hours	4 hours	7 hours	10 hours	8 hours	24 hours
98%	4 hours	5 hours	8 hours	14 hours	10 hours	30 hours
100%	5 hours	7 hours	9 hours	18 hours	11 hours	36 hours
* Tolerance of ±3%						

Tabelle 3: Loading times der DC Beads® für Doxorubicin-Lösung (Terumo, Biocompatibles)

Da sich diese Angaben lediglich auf den Beladungsvorgang als Ganzes beziehen und den zeitlichen Verlauf im Einzelnen nicht berücksichtigen, soll im folgenden in vitro Experiment eine Zeit- Dosis-Kurve ermittelt werden, welche die Beladungskinetik von Epirubicin in die DC Beads® näher charakterisiert. Zwar hat Epirubicin für eine DEB-TACE mit DC Beads® keine offizielle Zulassung, stellt aber ein Isoenantiomer zu Doxorubicin dar. Die verwendete Epirubicin- Stammlösung hat eine Konzentration von 25mg/ml. Für den Versuch wird sie allerdings in einer Verdünnung von 5mg/ml verwendet.

Beruhend auf der Eigenfarbe des Medikamentes kann das Prinzip der Durchlichtphotometrie angewandt werden. Im Verlauf des Beladungsvorganges lässt die Farbintensität der Zytostatikallösung nach, während sie in den Embolisaten zunimmt. Ursächlich dafür ist die Fähigkeit der Embolisate, das Doxorubicin aktiv aus der Lösung aufzunehmen [85]. Dieser Unterschied der Farbdichte kann durch photometrische Messung quantifiziert werden. Voraussetzung hierfür ist es, dass sich lediglich die Flüssigkeit im Strahlengang des Photometers befindet, während die Partikel auf dem Boden der Küvette lagern und somit nicht die Extinktion beeinflussen.

Es werden folgende Materialien benötigt:

- Rekonstituierte Epirubicin- Lösung 25mg/ml: aus Farmorubicin® 50mg HL mit 2ml 0,9% NaCl (ACTAVIS ITALY S.p.A.)
- DC Beads® 300-500µm, REF: DC2V305 (Terumo, Biocompatibles)
- Lovibond®- Photometer P 22, Serien- Nr: PC 22/2667 (Tintometer GmbH) mit Küvetten
- 20ml Spritze: Omnifix® Solo (Braun®)
- 10ml 0,9%NaCl Miniplasco (Braun®)
- Stoppuhr

Zu Beginn erfolgt die Leerwertbestimmung für die Photometrie mit 10ml 0,9%NaCl. Wie es die oben beschriebene Anleitung zum Beladen der DC Beads® vorgibt, wird zunächst der gesamte Inhalt der Glasampulle der DC Beads® unter Zuhilfenahme einer Spritze in eine 10 ml Küvette des Lovibond®- Photometer gefüllt und der flüssige Überstand entfernt, sodass sich die Mikrosphärenpartikel am Boden der Küvette absetzen. Als Nächstes werden 2 ml der Epirubicin – Stammlösung 25mg/ml dazugegeben und mit 8 ml 0,9% NaCl- Lösung verdünnt. In der Küvette befinden sich nun 50 mg Epirubicin auf 10 ml Flüssigkeit. Die Ausgangskonzentration für die Beladung der DC Beads® beträgt somit 5mg/ml. Die in der Küvette enthaltene Suspension wird in definierten zeitlichen Intervallen bei Raumtemperatur und einer Wellenlänge von 470 nm (Nanometer) für 20 Minuten photometrisch gemessen. Während des Vorganges ändert sich die Farbintensität der beteiligten Medien zugunsten der Drug- Eluting Beads. Dies kann als Indikator für eine erfolgreiche Beladung gewertet werden. Unter der Begebenheit, dass lediglich der flüssige Bestandteil der Suspension im Strahlengang des Photometers befindlich ist, gelingt es, die Aufnahme des Wirkstoffes in die DC Beads® im zeitlichen Verlauf zu quantifizieren.

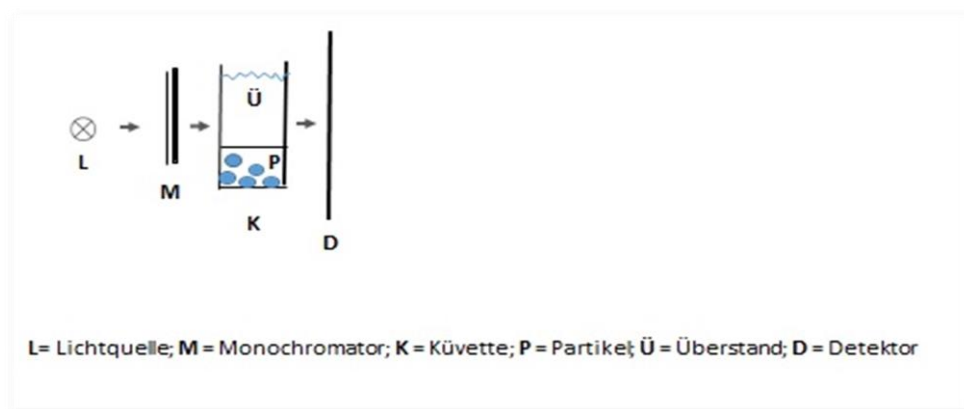


Abbildung 22: Durchlicht- Photometer

Zusammenfassend ist hier eine Übersicht über die Zusammensetzungen der Küvette und Ausgangswerte der Messung gegeben:

Eine 10 ml –Küvette enthält:

- 8 ml 0,9% NaCl (Natriumchlorid)- Lösung
 - 2 ml Epirubicin 25 mg/ml
 - DC Beads® ohne Überstand
- ⇒ Gesamtkonzentration Epirubicin als Ausgangswert: 5mg/ml

Versuchsbedingungen:

- Raumtemperatur
- Wellenlänge des Lovibond®- Photometer P 22: 470 nm
- Zeitintervalle:
 - Minute 0-5: Messung jede Minute
 - Minute 6-10: Messung alle 2,5 Minuten
 - Minute 11-20: Messung alle 5 Minuten

Für eine in vivo- Intervention mit DC Beads® ist aus der Gruppe der Anthrazykline jedoch lediglich Doxorubicin zugelassen. Deshalb soll für dieses Medikament eine zusätzliche in vitro- Untersuchung mittels Photometrie durchgeführt werden. Ziel ist es, den prozentualen Anteil der Doxorubicinkonzentration zu ermitteln, welcher von den DC Beads® im Rahmen des Beladungsvorganges aufgenommen wird und damit die Ladungskapazität dieser Sphären zu charakterisieren.

Für den Versuch wird folgendes Material benötigt:

- Doxorubicinhydrochlorid TEVA® 2mg/ml
- Überstand der Doxorubicin- Stammlösung nach 24 Stunden Inkubationszeit, geliefert von der Krankenhausapotheke des Universitätsklinikums Großhadern
- 2x 10ml 0,9%NaCl Miniplasco (Braun®)
- Dr. Lange Photometer LP 2 W, ID-Nr. 24901 (HACH LANGE GmbH)

Der Versuchsablauf gliedert sich in einen ersten experimentell ermittelten Teil und einen daran anschließenden rechnerisch ermittelten Teil.

Für den experimentellen Teil werden 0,5ml der Stammlösung Doxorubicin (2mg/ml) mit 10 ml 0,9% NaCl gemischt, sodass eine 1:20 Verdünnung entsteht. Von dieser Verdünnungsstufe werden nun 2ml in die Küvette des Photometers gegeben und mit einer Extinktion von 1268 erfasst. In gleicher Weise wird mit dem Überstand des Doxorubicins, welcher nach der Inkubationszeit des Beladungsvorganges von der Krankenhausapotheke in der Herstellung der Drug-Eluting Beads üblicherweise verworfen wird, verfahren. Es handelt sich also um den Überstand eines üblichen Beladungsvorganges, infolge dessen die Partikel mit 75mg Doxorubicin /2ml DC Beads® beladen sein sollen. Die 1: 20 Verdünnung ergibt bei dieser Messung einer Extinktion von 650. Die unterschiedlichen Werte der gleichen Verdünnungsstufe beruhen auf dem Doxorubicinverlust der gemessenen Flüssigkeit. Das Doxorubicin hat sich durch die Beladung in den DC Beads® eingelagert. Somit werden Werte für die native Stammlösung und die noch vorhandene Doxorubicinlösung nach erfolgreichem Beladungsvorgang photometrisch ermittelt und können rechnerisch verglichen werden.

Im rechnerischen Teil dieses Versuchsablaufes wird über die gemessenen Extinktionen auf die Konzentration des Doxorubicins in den Medien zurückgerechnet. Damit ist die Berechnung des von den DC Beads® aufgenommenen Wirkstoffes möglich.

3.2.2. Beladung von Embozene Tandem™ 100µm

3.2.2.1. Vorgang des Beladens von Embozene Tandem™ 100µm

Neben den DC Beads® haben auch andere Embolisationspartikel in den klinischen Alltag der DEB- TACE Einzug gehalten. Seit dem Jahr 2012 sind die Embozene Tandem™ der Firma Celo®Nova BioSciences, Inc. auf dem europäischen Markt verfügbar. Dabei handelt es sich um nicht-resorbierbare, hydrogelhaltige Mikrosphären, die mit einer anorganischen perfluorierten Polymer-Beschichtung versehen sind. Sie stellen eine Alternative zu den DC Beads® dar und versprechen die Durchführung einer superselektiven TACE durch noch geringere Durchmesserzahlen der Mikrosphären. Das verfügbare Repertoire der Embozene Tandem™ bietet Größen von 40µm, 75µm und 100µm, erhältlich in 2ml oder 3 ml Spritzen. Studien vergleichen verschiedene Größen von Embolisationspartikeln (70-150µm und 100-

300µm) im Schweinemodell und zeigen, dass Drug - Eluting Beads mit kleinem Durchmesser in weiter distal gelegenen Arterien lokalisiert sind und eine homogenere Verteilung aufweisen [86]. Je kleiner die Partikel sind, desto größer ist die relative Oberfläche und desto kürzer ist damit die Beladungszeit [87]. Zusätzlich sollen sich die Embozene Tandem™ durch die Qualitätsmerkmale Größenkonstanz, hohe Ladungskapazität, tiefere Penetration in die Tumorarterien und kontrollierte Medikamentenelution in vivo besonders auszeichnen [88]. Laut Hersteller dieser Embolisationspartikel besteht eine Zulassung für die Beladung mit Doxorubicin – HCL (Chlorwasserstoff) oder – Pulver, Epirubicin- HCL oder – Pulver, Irinotecan- HCL und Idarubicin-HCL. Vergleichbar mit den DC Beads® werden die Embozene Tandem™ in zeitlich kurzem Abstand vor der Intervention applikationsbereit beladen.

Die ordnungsgemäße Beladung dieser Embolisationspartikel wird in der folgenden Abbildung beschrieben. Die dafür verwendeten Materialien sind:

- Embozene Tandem™ 100µm, 2ml Spritze, REF: 11020-TS0 (Celo®Nova BioSciences, Inc.)
- Rekonstituierte Epirubicin- Lösung 25mg/ml: aus Farmorubicin® 50mg HL mit 2ml 0,9% NaCl (ACTAVIS ITALY S.p.A.)
- 20ml Spritze: Omnifix® Solo (Braun®)
- Sterican®Standardkanülen, Art.-No./Ref.:4657519, Pharmacy code: 2050798 (Braun®)

Zur Herstellung einer Epirubicin –Lösung mit der Konzentration 10mg/ml werden dem Epirubicin- Pulver 50mg zunächst 5 ml 0,9% NaCl hinzugefügt (Schritt 1). Nach Entfernung der Embozene Tandem™ aus ihrer sterilen Verpackung wird der Inhalt der Spritze geschüttelt und gewartet, bis sich die Partikel aufgrund ihres Eigengewichtes am Spritzenboden absetzen, sodass der kochsalzhaltige Überstand entfernt werden kann (Schritt 2). Um nun die beiden Medien zu verbinden wird die Epirubicin- Lösung in die Embozene Tandem™ tragende Spritze aufgezogen. Die entstandene Suspension wird nun in regelmäßigen Abständen während einer Inkubationszeit von 60 Minuten geschüttelt, um das gewünschte Ergebnis einer Beladung von 98% zu erzielen (siehe Tabelle 4) (Schritt 3). Vor der endgültigen Applikation wird der Überstand entfernt und verworfen (Schritt 4). Die maximal zu erreichende Beladungsdosis beläuft sich laut Celo®Nova BioSciences, Inc. auf 50mg Epirubicin/1ml Embozene Tandem™.

Loading Guidance

–A Step by Step Reference for Clinicians–

Step 1 – Hydrate Powdered Drug with WFI

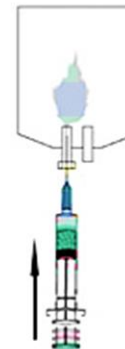
- Skip Step 1 if drug is in solution -

- 1.1 Hydrate powdered drug with WFI — for required amount of WFI and Max Dose, see Table 2.



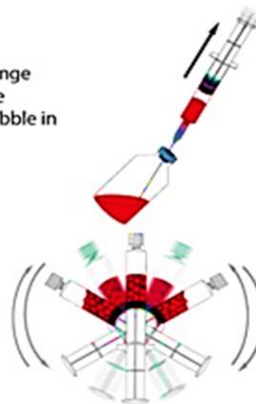
Step 2 – Microspheres Preparation

- 2.1 Open box and remove inner packaging. Verify sterile package is free of damage. Do not use if sterile barrier is broken.
- 2.2 Peel tyvek lid to open sterile package and remove syringe from tray.
- 2.3 Gently swirl contents and allow microspheres to settle towards the plunger for 2-5 minutes.
- 2.4 Attach a sterile filter needle to the syringe and eject transport solution — Avoid disturbing microspheres and never compress microspheres.
- 2.5 Remove the filter needle and attach a sterile needle.



Step 3 – Drug Loading

- 3.1 Transfer drug from its container to the Embozene TANDEM® Microspheres syringe by drawing solution into syringe via the attached sterile needle. Leave an air bubble in the syringe for better mixing.
- 3.2 Re-cap syringe.
- 3.3 Mix by inverting the syringe every 5 minutes for the first 30 minutes and occasionally thereafter. Allow for sufficient loading time per Table 3.
- 3.4 After drug loading is complete, if not used immediately, store in a dark location at 2-8°C.



Step 4 – Liquid Removal

- 4.1 Prior to delivery to the physician, allow the drug loaded microspheres to settle towards the plunger.
- 4.2 Attach a sterile filter needle to the syringe and eject supernatant solution — Avoid disturbing microspheres and never compress microspheres.
- 4.3 Re-cap syringe.

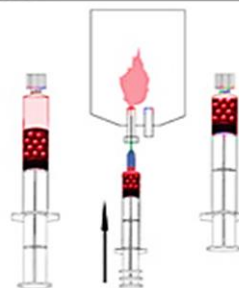


Abbildung 23: Loading Guidance der Embozene Tandem™ (Celo®Nova BioSciences, Inc.)

Die Fertigung der beladenen Embozene Tandem™ findet für die in vitro Versuche dieser Arbeit unter unsterilen Bedingungen statt, da das hergestellte Medizinprodukt nicht für die Verwendung am Patienten bestimmt ist. Des Weiteren wird hier das rekonstituierte Epirubicin aus Epirubicin- Pulver 50 mg und 2 ml 0,9%NaCl hergestellt. Die entstandene Epirubicin-Lösung hat also eine Konzentration von 25mg/ml besitzt. Damit erfolgt die Herstellung des rekonstituierten Epirubicins nach gleicher Anleitung wie die Herstellung des rekonstituierten Doxorubicins.

Rechnung zur Beladung der Embozene Tandem™ mit Epirubicin- Pulver 50mg

Epirubicin - Pulver: 50 mg

Zur Herstellung einer rekonstituierten Epirubicin- Lösung: 2ml 0,9%NaCl

Rekonstituierte Epirubicin- Lösung: 25mg/ml

Menge der verwendeten Stammlösung: 3ml

Konzentration der verwendeten Stammlösung für eine Embozene Tandem™ - 2ml Spritze:

$$3\text{ml} \times 25 \text{ mg/ml} = 75 \text{ mg Epirubicin} / 2 \text{ ml Embozene Tandem}^{\text{TM}} = 37,5 \text{ mg/ ml}$$

Eine kühle Lagerung der beladenen Mikrosphären bei 2-8 °C und die Durchführung der DEB-TACE innerhalb von 48 Stunden nach Beladung der Embozene Tandem™ wird empfohlen. Für die Beladung mit dem Isoenantiomer Doxorubicin wird nach Herstellerangaben eine Haltbarkeit im beladenen Zustand von 14 Tagen diskutiert.

Drug Loading Time		
Drug	Loading Time (minutes)	Drug Loaded
Doxorubicin-HCl (Powder)	60	98 ± 2 %
Epirubicin-HCl (Powder)	60	98 ± 2 %
Irinotecan-HCl (Solution)	30	98 ± 2 %

Tabelle 4: Drug Loading Time der Embozene Tandem™
(Celo®Nova BioSciences, Inc)

3.2.2.2. Mikroskopie verschiedener Zustände der Embozene Tandem™ 100µm während des Beladungsvorganges mit Epirubicin 25mg/ml

Um die elastischen Fähigkeiten der Embozene Tandem™ während des Beladungsvorganges mit Epirubicin in vitro zu untersuchen, werden mit Hilfe des Auflicht-Mikroskopes Bildaufnahmen der nativen und beladenen Sphären angefertigt. Der Hersteller gibt für die Embozene Tandem™ eine morphologische Stabilität an. Demnach soll sich die Größe der Partikel während des Beladens und auch während der Aufbewahrung bis zur klinischen Verwendung am Patienten weniger als 5% ändern.

Zusätzlich werden die im Nativzustand farblosen Embozene Tandem™ 15 min und 60 min nach dem Erstkontakt mit der roten Epirubicin-Lösung 25mg/ml mikroskopisch erfasst. Die dabei entstehende Änderung der Farbintensität zeigt den Medikamententransfer aus der Lösung in die Embozene Tandem™ an.

3.3. Vergleichende Betrachtung der Elution verschiedener Drug- Eluting Beads bei 37°C in vitro

Neben den Experimenten zur Beladungskinetik der DC Beads® und Embozene Tandem™ wurden im Zeitraum Februar 2014 bis September 2014 auch in vitro Versuche zu deren Elutionskinetik durchgeführt. Elution beschreibt die Fähigkeit der Sphären, den in ihnen enthaltenen Wirkstoff in vivo freizusetzen. Da dies auf der Grundlage des Ionenaustausches geschieht, kann eine Elution nur im ionentragenden Medium stattfinden [83]. Abhängig ist die Kinetik der Elution unter anderem vom Sphärendurchmesser der jeweiligen Drug- Eluting Beads. Je kleiner die Sphären sind, desto schneller findet analog zur Beladung auch die Elution statt [87].

In den folgenden in vitro- Experimenten wird zunächst ein Vergleich beladener DC Beads® angestellt. Zum einen sind sie mit Doxorubicin- Lösung 2mg/ml beladen, zum anderen mit einer aus Doxorubicin –Pulver rekonstituierten Lösung der Konzentration 25mg/ml. Außerdem wird das Elutionsverhalten der DC Beads® und Embozene Tandem™ in zwei Versuchsaufbauten vergleichend erforscht. Ein geschlossenes und ein offenes Testsystem stellen dabei unterschiedliche Ansprüche an die Elutionskinetik der Sphären. Sämtliche Experimente finden bei 37°C Raumtemperatur statt.

3.3.1. Elution von Doxorubicin – Lösung 2mg/ml und rekonstituiertem Doxorubicin 25mg/ml aus DC Beads® 300-500µm im offenen System

Die DC Beads® können in ihrer Eigenschaft als Drug- Eluting Beads sowohl mit Doxorubicin- Lösung 2mg/ml als auch mit einer aus Doxorubicin- Pulver 50mg rekonstituierten Lösung der Konzentration 25mg/ml beladen werden. Welchen Einfluss dies auf die Abgabe des Wirkstoffes aus den DC Beads® hat, soll in einem offenen in vitro- Testsystem untersucht werden. Dabei wird die Dynamik der Elution der unterschiedlich beladenen DC Beads® zeitgleich über insgesamt 242 Stunden beobachtet und photometrisch quantifiziert.

3.3.1.1. Verwendetes Material

Eine Zusammenschau aller für diesen Versuch verwendeten Materialien soll einen Überblick verschaffen, bevor im Weiteren der Aufbau und Ablauf des Experimentes näher beschrieben werden.

- Durch die Krankenhausapotheke des Universitätsklinikums München Großhadern beladenen Embolisationspartikel:
 - 1 Ampulle DC Beads® 300-500µm, REF: DC2V305 (Terumo, Biocompatibles) beladen mit 37,5 ml Doxorubicinhydrochlorid TEVA® 2mg/ml
 - 1 Ampulle DC Beads® 300-500µm, REF: DC2V305 (Terumo, Biocompatibles) beladen mit 3 ml rekonstituiertem Doxorubicin 25mg/ml, hergestellt aus Doxorubicin- Actavis 50mg Pulver
- Aufbau des offenen Systems:
 - Perfusor® segura ft (Braun®)
 - Perfusor® fm (MFC) (Braun®)
 - 2 BD Perfusion™ Spritze 50ml, Artikelnummer: 510070 (BD)
 - 2 x 2 isotone Kochsalzlösung 0,9% 500ml (Braun®)
 - 4 Spritzenpumpenleitung, REF:9004152, LOT: 84372194 (Fresenius Kabi AG)
 - 4 Discofix® C Dreiwegehahn (Braun®)
 - 2 Intrapur®Lipid 1,2µm Infusionsfilter (Braun®)
 - 2 Auffangbehälter: Injekt®Solo 2-teilige Einmalspritze 10 ml (Braun®)
 - Schaumstoffblock (Xodus Medical, inc.)
 - Klebeband

- Benötigtes Material bei Verlängerung der zeitlichen Messintervalle:
 - Auffangbehälter: 2 BD Perfusion™ Spritze 50ml, Artikelnummer: 510070 (BD)
 - Abdeckung eines durchstichsicheren Abwurfbehälter
 - Infusionsständer
 - 5 x 2 isotone Kochsalzlösung 0,9% 500 ml (Braun®)
 - 2 Infusionsgerät mit integriertem Präzisionsregler BD R87 G Precision IG-G, REF: 396361, LOT:4205734 (Becton Dickinson Infusion Therapy AB)
 - Auffangbehälter: 8 x 2 leere isotone Kochsalzlösung 0,9% 500ml- Flaschen
 - 2 Entlüftungskanüle: Extra-Spike®, REF: 2902842 (Fresenius Kabi AG©)
 - 2 Teflonkatheter: Metall-Dilatator mit 5F Teflonkatheter, REF: R-51100, LOT: 131114RO-10 (Peter Pflugbeil GmbH)
 - 2 x 20 ml Spritze: Omnifix® Solo (Braun®)
 - 2 Sterican®Standardkanülen, Art.-No./Ref.:4665120, Pharmacy code: 2057955 (Braun®)

- Zusätzliches Material:
 - Lovibond®- Photometer P 22, Serien- Nr: PC 22/2667 (Tintometer GmbH) inkl. 2 durchsichtige Küvetten und Plastikgestell als Halterung für Küvetten, Wellenlänge 470nm (blau) als Komplementärfarbe
 - Leerwertbestimmung Küvette: 10 ml isotone Kochsalzlösung 0,9% (Braun®)
 - Digitales Thermometer
 - Uhr

3.3.1.2. Versuchsaufbau und – ablauf

Der Versuchsaufbau ist als offenes Testsystem gestaltet, welches bei 37°C über eine Gesamtdauer von 242 Stunden kontinuierlich in Betrieb ist. Analog der vivo Verhältnisse eluieren die mit Doxorubicin beladenen DC Beads® den Wirkstoff über diese Zeitdauer. In der Kochsalzlösung kann die abgegebene Doxorubicinkonzentration im zeitlichen Verlauf photometrisch erfasst werden und somit die Kinetik der Elution erforscht werden. Da es sich

um einen offenen Versuchsaufbau handelt, ist nicht mit einer Sättigung der Messflüssigkeit zu rechnen. Dies geschieht in Anlehnung an den menschlichen Körperkreislauf, bei dem aufgrund der Menge des zirkulierenden Blutvolumens ebenfalls kein Sättigungseffekt eintritt. Aus den Messergebnissen werden die entsprechenden Elutionskurven erstellt.

Folgende Skizze stellt den Aufbau des in vitro- Experimentes dar:

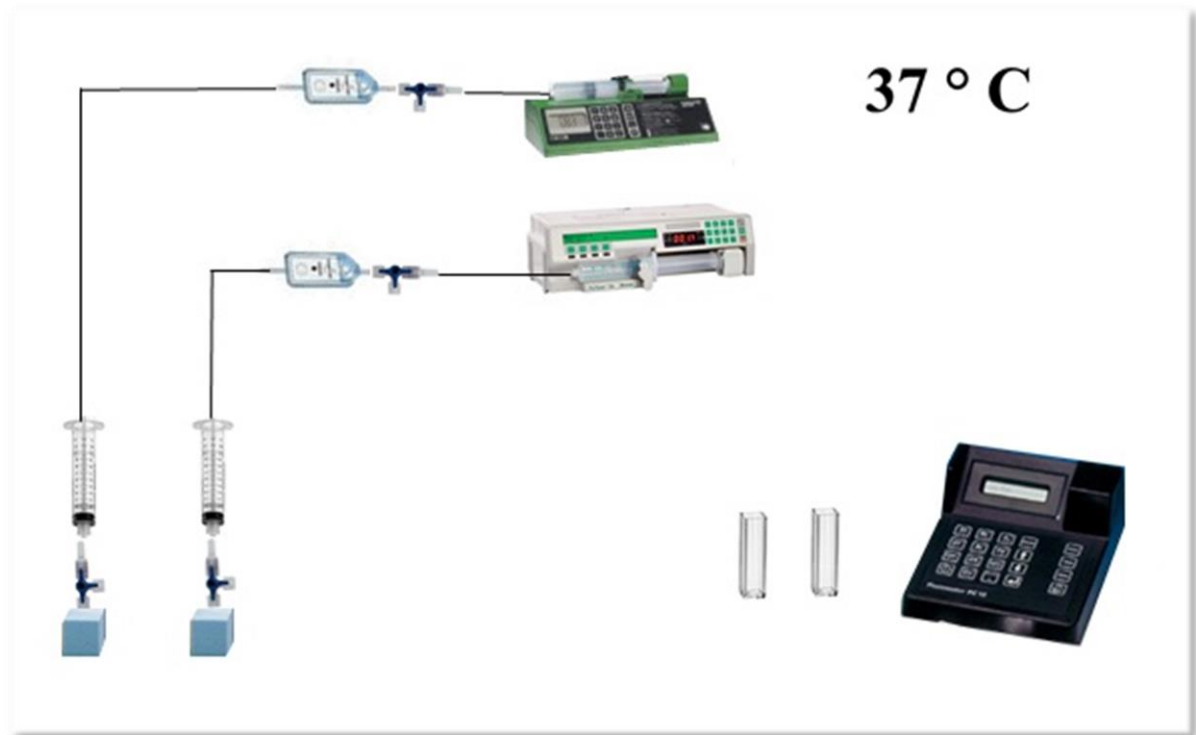


Abbildung 24: schematischer Versuchsaufbau der Elution von Doxorubicin-Lösung 2mg/ml und rekonstituiertem Doxorubicin 25mg/ml aus DC Beads® 300-500µm im offenen Systems

Zunächst werden die DC Beads® vor Beginn des Experimentes fachgerecht von der Krankenhausapotheke des Universitätsklinikums München Großhadern beladen und applikationsbereit geliefert:

Beladung der DC Beads® 300-500µm (2ml Ampulle) mit Doxorubicin- Stammlösung:

Doxorubicin - Stammlösung: 2 mg/ml

Menge der verwendeten Stammlösung: $3 \times 12,5 \text{ ml} = 37,5 \text{ ml}$

Konzentration der verwendeten Stammlösung für eine DC Bead® - 2ml Ampulle:

$37,5 \text{ ml} \times 2 \text{ mg/ml} = 75 \text{ mg Doxorubicin} / 2 \text{ ml DC Beads®} = 37,5 \text{ mg/ ml}$

Beladung der DC Beads® 300-500 µm (2 ml Ampulle) mit Doxorubicin- Pulver:

Doxorubicin - Pulver: 50 mg

Zur Herstellung einer rekonstituierten Doxorubicin- Lösung: 2 ml steriles Wasser

Rekonstituierte Doxorubicin- Lösung: 25 mg/ml

Menge der verwendeten Stammlösung: 3 ml

Konzentration der verwendeten Stammlösung für eine DC Bead® - 2ml Ampulle:

$$3 \text{ ml} \times 25 \text{ mg/ml} = 75 \text{ mg Doxorubicin} / 2 \text{ ml DC Beads®} = 37,5 \text{ mg/ ml}$$

Rein rechnerisch liegt die Aufnahmekapazität der DC Beads® unter Idealbedingungen bei 37,5mg Doxorubicin pro 1ml DC Beads®.

Die beladenen Sphären werden jeweils über die Dreiwegehähne in die beiden Infusionsfilter appliziert. Aufgrund des günstigen Größenverhältnisses zwischen Filterpapier und DC Beads® verbleiben die Partikel über die gesamte Versuchsdauer dort, während die umgebende Flüssigkeit diesen ungehindert passieren kann.

Die beiden Perfusoren werden mit 50 ml isotoner Kochsalzlösung bestückt, welche auf 37 °C vorgewärmt wurde, und sind auf eine Laufrate von 12ml/h justiert. Mit dieser konstanten Geschwindigkeit umspült ihre Flüssigkeit die DC Beads®. Die dabei entstehende Farbänderung der Lösung korreliert mit deren Doxorubicingehalt.

Als Auffangbehälter für die Messflüssigkeit dienen zwei Spritzen. Für diesen Zweck werden sie von ihrem Stempel befreit und mit dem Konus im Schaumstoffblock befestigt. Damit für die photometrischen Messungen eine gefahrenlose Entnahme der zytostatikahaltigen Flüssigkeiten aus den Behältnissen möglich ist, wird ein Dreiwegehahn verwendet. Nach der Messung wird der Inhalt der Küvetten verworfen.

Das verbindende Schlauchsystem einzelner Elemente des Versuchsaufbaus stellen Spritzenpumpenleitungen dar.

Im Verlauf des Experimentes werden die Messintervalle zunächst von einer Stunde auf vier Stunden und schließlich auf 24 Stunden erhöht. Um die Bereitstellung des benötigten

Flüssigkeitsvolumens und deren sichere Handhabung weiterhin zu gewährleisten, wird der Versuchsaufbau folgendermaßen modifiziert:

Bei Verlängerung der Messintervalle von einer Stunde auf vier Stunden werden aufgrund des höheren Fassungsvermögens Perfusionsspritzen als Auffangbehälter verwendet. Der Dreiwegehahn ist nun nicht mehr im Schaumstoffblock befestigt, sondern hängt frei schwebend im Deckel eines Abwurfbehälters an der Tischkante.

Im Rahmen der 24-stündigen Messintervalle dienen als Quelle der Flüssigkeit nicht länger die Perfusoren, sondern 2 x 500 ml 0,9%NaCl- Flaschen, welche ebenfalls auf 37°C vorgewärmt sind und an einem gemeinsamen Infusionsständer befestigt sind. Um weiterhin eine Laufrate von 12ml/h sicherzustellen, werden die Flaschen an ein Infusionsbesteck mit integriertem Präzisionsregler angeschlossen. Außerdem dienen nun zwei leere 500ml- Flaschen als Auffangbehälter. Zwischen diesen und dem Schlauchsystem wird jeweils ein Teflonkatheter eingebaut, sodass die doxorubicinhaltige Flüssigkeit in die Flaschen tropfen kann. Eine zusätzliche Entlüftungskanüle in der Flasche ist zum Ausgleich der Druckverhältnisse vorhanden. Zur photometrischen Messung werden die benötigten 10 ml bei dieser Konstruktion aus der 500ml NaCl- Flasche abgezogen, der restliche Inhalt wird verworfen.

3.3.2. Elution von Epirubicin 25mg/ml aus DC Beads® 300-500µm und Embozene Tandem™ 100µm im geschlossenen System

Neben den DC Beads® eignen sich auch die Embozene Tandem™ für die interventionelle DEB-TACE. Um mögliche Unterschiede in deren Elutionskinetik festzustellen und damit potentielle Vor- und Nachteile aufzudecken, werden die beiden mit Epirubicin beladenen Drug-Eluting Beads in einem in vitro Versuch vergleichend getestet. Diesmal kommt ein geschlossenes Testsystem zur Anwendung. Erfasst wird die Elution photometrisch über die damit verbundene Farbänderung der ursprünglich klaren Flüssigkeit. In Abhängigkeit der Zeit werden schließlich Elutionskurven für beiden Sphären erstellt.

3.3.2.1. *Verwendetes Material*

Für dieses in vitro Experiment werden folgende Materialien verwendet:

- Beladung der Embolisationspartikel:
 - DC Beads® 300-500µm, REF: DC2V305 (Terumo, Biocompatibles)
 - Embozene Tandem™ 100µm, 2ml Spritze, REF: 11020-TS0 (Celo®Nova BioSciences, Inc.)
 - 3ml rekonstituierte Epirubicin- Lösung 25mg/ml: aus Farmorubicin® 50mg HL mit 2ml 0,9% NaCl (ACTAVIS ITALY S.p.A.)
 - 2 x 20 ml Spritze: Omnifix® Solo (Braun®)
 - 2 Sterican®Standardkanülen, Art.-No./Ref.:4665120, Pharmacy code: 2057955 (Braun®)
- Aufbau des geschlossenen Kreislaufes:
 - Rollenpumpe: LKB 2132 Microperpex Peristaltic Pump (Pharmacia LKB Biotechnology AB), Schweden
 - Silikonschlauch: Silikon- Absaugschlauch VBM-68-010-10 (Wolfram Droh GmbH)
 - Schlauch: Combidyn Druckschlauch 50cm Transparent, REF: 5205000, LOT: 1G2988-09 (Braun®)
 - 2 isotone Kochsalzlösung 0,9% 500ml (Braun®)
 - 2 Intrapur®Lipid 1,2µm Infusionsfilter (Braun®)
 - 6 Discofix® C Dreiwegehahn (Braun®)
 - 2 Entlüftungskanüle: Extra-Spike®, REF: 2902842 (Fresenius Kabi AG©)
 - 6 Kanüle: IntroKan Seldinger Kanüle G18 x70mm, Art.-Nr.: 1181210 (Angiokard Medizintechnik GmbH)
 - 2 Teflonkatheter: Metall-Dilatator mit 5F Teflonkatheter, REF: R-51100, LOT: 131114RO-10 (Peter Pflugbeil GmbH)
 - dunkles Klebeband
 - Zange

- Zusätzliches Material außerhalb des geschlossenen Kreislaufes:
 - Lovibond®- Photometer P 22, Serien- Nr: PC 22/2667 (Tintometer GmbH) inkl. 2 durchsichtige Küvetten und Plastikgestell als Halterung für Küvetten, Wellenlänge 470nm (blau) als Komplementärfarbe
 - Leerwertbestimmung Küvette: 10 ml isotone Kochsalzlösung 0,9% (Braun®)
 - Digitales Thermometer
 - Uhr

3.3.2.2. Versuchsaufbau und –ablauf

Die zu vergleichenden Drug- Eluting Beads werden in zwei voneinander getrennten, jedoch parallel betriebenen, geschlossenen Kreisläufen getestet. Im Gegensatz zum vorherigen Versuchsaufbau wird im nun vorliegenden geschlossenen System die zirkulierende Messlösung im Verlauf des Experimentes nicht erneuert. Die stets identische Flüssigkeitsmenge weist also einen zunehmenden Doxorubicingehalt auf, der photometrisch erfasst wird. Mit der Zeit ist von einer Sättigung auszugehen, sodass dieses Modell als Simulation für eine in vivo stehende, tumornahe Blutsäule nach erfolgreicher Embolisation gewertet werden kann. Über eine Versuchsdauer von 166 Stunden werden bei 37°C die Messwerte in definierten Zeitintervallen erhoben und anschließend graphisch dargestellt.

Der Versuchsaufbau gestaltet sich folgendermaßen:

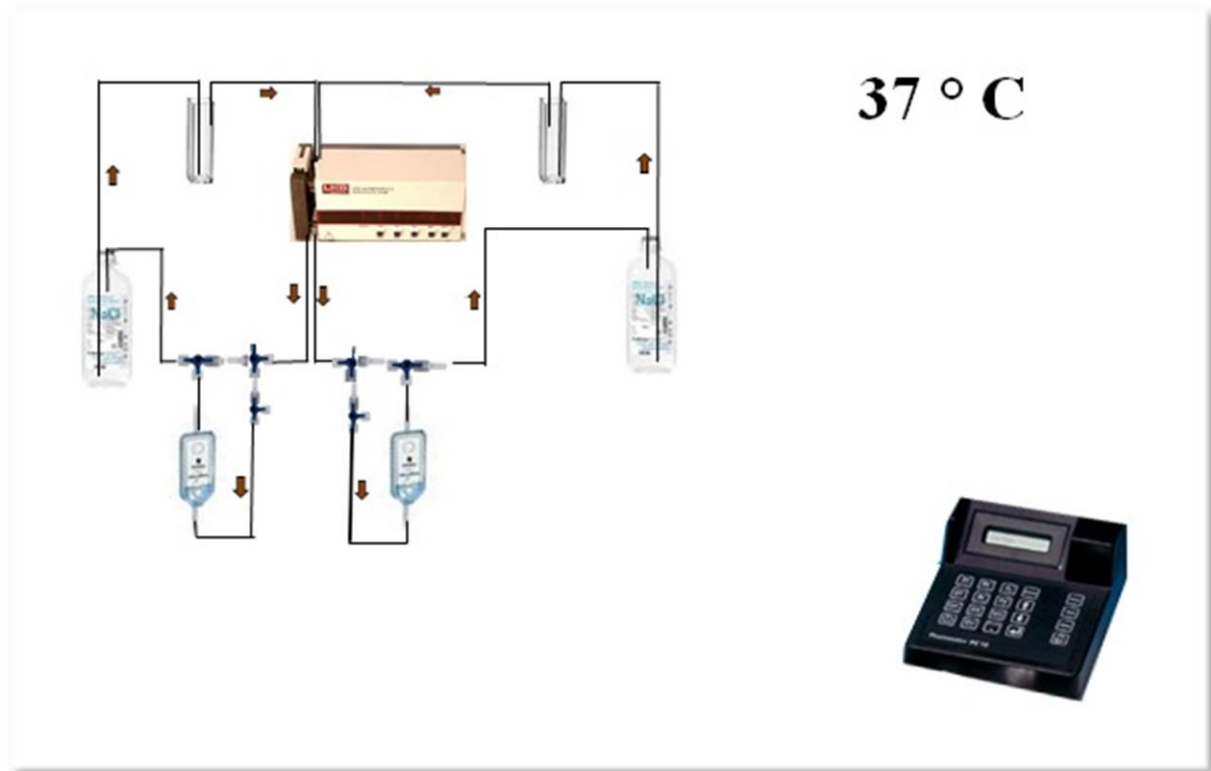


Abbildung 25: schematischer Versuchsaufbau der Elution von Epirubicin 25mg/ml aus DC Beads® 300-50µm und Embozene Tandem™ 100µm im geschlossenen System

Die DC Beads® und Embozene Tandem™ werden mit Epirubicin 25mg/ml nach oben beschriebener Anleitung beladen. Zum Zweck dieser Arbeit erfolgt die Beladung unter unsterilen Bedingungen und hat Sphären von jeweils 37,5mg Epirubicin / 1 ml DC Beads® beziehungsweise 37,5mg Epirubicin/ 1 ml Embozene Tandem™ zur Folge. Diese werden über die Dreiwegehähne in die dafür vorgesehenen Infusionsfilter appliziert. Dort lagern sie über die gesamte Versuchsdauer und werden von der Messflüssigkeit permanent umspült.

Gemeinsamer Antrieb der beiden Kreisläufe ist eine Rollenpumpe, welche Spulen für zwei Silikonschläuche enthält. Sie sind aufgrund ihres Durchmessers und Materials für eine reibungslose Funktionsfähigkeit der Rollenpumpenspule geeignet. Das weitere Schlauchsystem besteht aus Druckschläuchen anderen Materials. Die Pumpe wird kontinuierlich im Modus „CW“ (clockwise) mit einer Laufrate von 75ml/h betrieben. Die Skizze des Versuchsaufbaus zeigt die Laufrichtung der Messlösung.

Das zirkulierende Flüssigkeitsvolumen jedes Kreislaufes setzt sich zusammen aus einer 500 ml 0,9%NaCl- Flasche und 10 ml 0,9%NaCl in den Küvetten und ist zu Beginn des Versuches auf 37°C gewärmt.

Ein sicherer Umgang mit dem zytostatischen Wirkstoffes wird gewährleistet, indem jede 500ml Flasche eine kurze Kanüle für den Zufluss und einen langen, auf den Behältnisboden reichenden Teflonkatheter für den Abfluss enthält, sodass ein Austreten der Flüssigkeit verhindert wird. Die Küvetten werden ebenfalls jeweils mit einer langen Kanüle für den Zufluss und einer kurzen für den Abfluss ausgestattet. Zu beachten ist, dass der horizontale Strahlengang des Photometers während der Messung hierdurch nicht beeinflusst wird. Im Weiteren enthält jede 500ml Flasche eine Entlüftungskanüle, um die Druckverhältnisse in der Flasche zu kontrollieren.

Die DC Beads® und Embozene Tandem™ eluieren kontinuierlich das in ihnen enthaltene Epirubicin, sichtbar an zunehmenden Rotfärbung der ursprünglich klaren 0,9%NaCl- Lösung. In definierten Zeitabständen werden die 10 ml Küvetten photometrisch gemessen, ohne dabei die Küvette selbst aus ihrer Schlauchkonstruktion zu entfernen oder den Kreislauf für die Zeit der Messung zu stoppen. Die mit Kanülen präparierten Küvettendeckel verhindern allerdings eine vollständige Abschirmung der Küvette gegenüber Licht im Strahlengang. Um dennoch eine qualitativ hochwertige Messung zu erreichen, wird die Küvette an ihrem lichtexponierten Ende mit dunklem Klebeband abgedeckt. Dieses Verfahren wurde auch bei der Leerwertbestimmung angewandt.

3.3.3. Elution von Mitoxantron 2mg/ml aus DC Beads® 300-500µm und Embozene Tandem™ 100µm im offenen System

Mögliche Unterschiede im Elutionsverhalten der DC Beads® und Embozene Tandem™ werden nicht nur im geschlossenen Testmodell mit Epirubicin, sondern auch im offenen Versuchsaufbau mit Mitoxantron untersucht. Zwar besitzt letztgenannter Wirkstoff für die Anwendung der DEB-TACE keine Zulassung, eignet sich aber aufgrund seiner chemischen Struktur für dieses in vitro Experiment. Er wird ebenfalls von den genannten Drug – Eluting Beads über die Versuchsdauer eluiert. In der Messlösung kann er analog den bisherigen Versuchsaufbauten durch seine blaue Eigenfarbe photometrisch quantifiziert werden und im zeitlichen Verlauf ausgewertet werden.

3.3.3.1. *Verwendetes Material*

Eine Zusammenstellung des verwendeten Materials liefert diese Liste:

- Beladung der Embolisationspartikel:
 - DC Beads® 300-500µm, REF: DC2V305 (Terumo, Biocompatibles)
 - Embozene Tandem™ 100µm, 2ml Spritze, REF: 11020-TS0 (Celo®Nova BioSciences, Inc.)
 - 2x 10 ml Mitoxantron 2mg/ml: Novantron 20mg/10ml (Meda)
 - 2 x 20 ml Spritze: Omnifix® Solo (Braun®)
 - 2 Sterican®Standardkanülen, Art.-No./Ref.:4665120, Pharmacy code: 2057955 (Braun®)
- Aufbau des offenen Systems:
 - 5 x 2 isotone Kochsalzlösung 0,9% 500ml (Braun®)
 - Infusionsständer
 - 2 Infusionsgerät mit integriertem Präzisionsregler BD R87 G Precision IG-G, REF: 396361, LOT:4205734 (Becton Dickinson Infusion Therapy AB)
 - 6 Discofix® C Dreiwegehahn (Braun®)
 - 2 Intrapur®Lipid 1,2µm Infusionsfilter (Braun®)
 - 2 Spritzenpumpenleitung, REF:9004152, LOT: 84372194 (Fresenius Kabi AG)
 - 2 Auffangbehälter: Mark V Pro Vis® 200ml FasTurn Sterile Disposable Syringe & QFT, REF: 200-FT- Q, LOT: 131272 (MEDRAD Interventional®)
 - Klebeband
- Zusätzliches Material:
 - Lovibond®- Photometer P 22, Serien- Nr: PC 22/2667 (Tintometer GmbH) inkl. 2 durchsichtige Küvetten und Plastikgestell als Halterung für Auffangbehälter, Wellenlänge 660nm (rot) als Komplementärfarbe
 - Leerwertbestimmung Küvette: 10 ml isotone Kochsalzlösung 0,9% (Braun®)
 - Digitales Thermometer
 - Uhr

3.3.3.2. Versuchsaufbau und -ablauf

Die vergleichende Betrachtung des Elutionsverhaltens von DC Beads® und Embozene Tandem™ beinhaltet auch deren Betrachtung im offenen Versuchsaufbau. Da hierbei die Testflüssigkeit stets erneuert wird, dient das Experiment als Simulation des Körperkreislaufes, bei dem eine Sättigung des Zytostatikums im zirkulierenden Blutvolumen keine Rolle spielt. Damit die Versuchsbedingungen den in vivo Verhältnissen möglichst nahe kommen, wird eine Raumtemperatur von 37 °C gewählt. Über eine Versuchsdauer von etwa 166 Stunden werden die Messwerte erhoben, um anschließend geeignete Elutionskurven zu ermitteln.

Den Aufbau des Experimentes zeigt folgende Skizze:

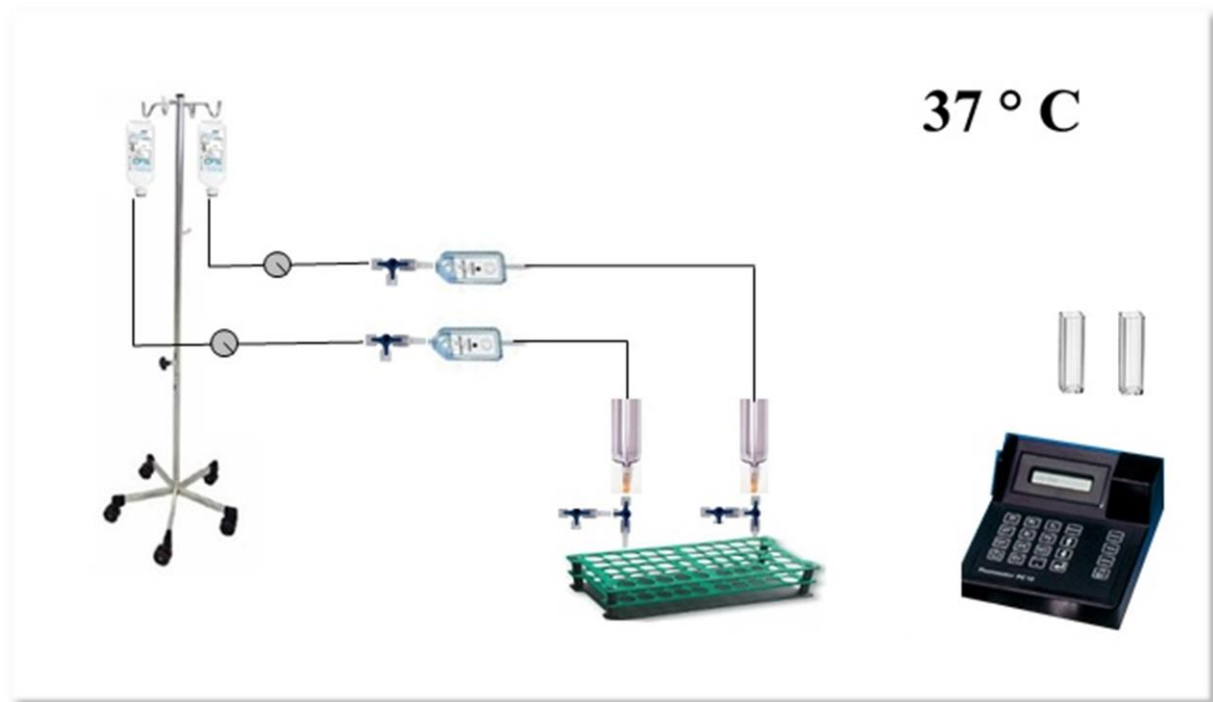


Abbildung 26: schematischer Versuchsaufbau der Elution von Mitoxantron 2mg/ml aus DC Beads® 300-500µm und Embozene Tandem™ 100µm im offenen System

Bevor das Experiment starten kann, werden die DC Beads® und Embozene Tandem™ mit Mitoxantron 2mg/ml beladen und inkubiert. Unter unsterilen Bedingungen werden die beiden Sphären nach oben genannter Anleitung mit jeweils 10 ml des Wirkstoffes beladen und erreichen so eine Zielkonzentration von 10mg Mitoxantron / 1ml DC Bead® beziehungsweise 10mg Mitoxantron / 1ml Embozene Tandem™.

DC Beads:

Mitoxantron - Stammlösung: 2 mg/ml

Menge der verwendeten Stammlösung: 10 ml

Konzentration der verwendeten Stammlösung für eine DC Bead® - 2ml Ampulle:

$$10 \text{ ml} \times 2 \text{ mg/ml} = 20 \text{ mg Mitoxantron} / 2 \text{ ml DC Beads®} = 10 \text{ mg/ ml}$$

Embozene Tandem™:

Mitoxantron - Stammlösung: 2 mg/ml

Menge der verwendeten Stammlösung: 10 ml

Konzentration der verwendeten Stammlösung für eine Embozene Tandem™ - 2ml Ampulle:

$$10 \text{ ml} \times 2 \text{ mg/ml} = 20 \text{ mg Mitoxantron} / 2 \text{ ml Embozene Tandem™} = 10 \text{ mg/ ml}$$

Nach der Inkubationszeit werden die beladenen Sphären über die Dreiwegehähne in die dafür vorgesehenen Infusionsfilter gespritzt. Ein handelsüblicher Infusionsständer dient als Halterung für die beiden auf 37 °C vorgewärmten 500 ml 0,9%NaCl- Flaschen. Über Infusionsbesteck mit integriertem Präzisionsregler sind die Flaschen mit den Sphären tragenden Infusionsfilter verbunden. Der Tropfenzähler stellt mit seiner Laufrate von circa 12 ml /h eine konstante Fließgeschwindigkeit sicher.

Das Schlauchsystem wird durch Spritzenpumpenleitungen komplettiert. Bevor die Enden dieser Schläuche nun frei hängend mit Klebeband am Rand der Auffangbehälter befestigt werden können, muss der schwarze Konus des Behältnisses entfernt werden.

Um eine stabile Konstruktion zu gewährleisten, werden die Auffangbehältnisse in einer Plastikhalterung platziert. Eine Konstruktion aus zwei Dreiwegehähnen dient der sicheren Handhabung der zytostatikahaltigen Lösung, sodass die Messflüssigkeit zum Zweck der Photometrie dosiert in die 10ml Küvetten entlassen werden kann. Der in den Auffangbehältnissen verbleibende Rest wird verworfen. Ab Stunde 71 des Experimentes werden Mittelwerte der Messwerte gebildet.

4. Ergebnisse

4.1. Kathetergängigkeit der Embolisationspartikel

Zur Veranschaulichung der elastischen Fähigkeiten ausgewählter Embolisationspartikel werden die Partikel in einer Dreierfolge von mikroskopischen Abbildungen dargestellt. Die erste Aufnahme demonstriert jeweils die Morphologie der Embolisationspartikel im nativen Zustand vor deren Katheterpassage, die zweite Aufnahme deren Verformung bei Durchlaufen des gläsernen Simulationskatheters und die dritte Aufnahme ihren Zustand nach Katheterpassage.

4.1.1. Verhalten der EmboCept®- Partikel bei der in vitro Untersuchung

Die homogen geformten Sphären erfahren aufgrund des günstigen Verhältnisses zwischen Sphärendurchmesser und Katheterdurchmesser keinerlei Hindernis bei der Katheterpassage. Diese lassen sich problemlos durch den Simulationskatheter spritzen und verlassen diesen morphologisch unverändert.

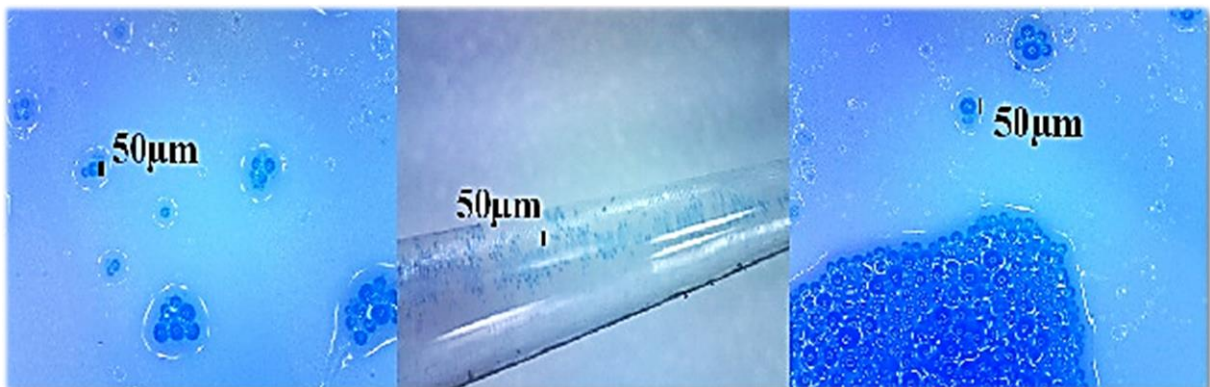


Abbildung 27: EmboCept® Microspheres (PharmaCept) vor, während und nach der Katheterpassage (hier blau gefärbt)

4.1.2. Verhalten von Weichweizengrieß bei der in vitro Untersuchung

Die Passage des Weichweizengrießes durch den Simulationskatheter gestaltet sich schwierig, da die Größe der Körner den Innendurchmesser des Simulationskatheters überschreitet. Letztlich gelingt es, das Probematerial mittels Inflationsgerätes und Leitungswasser durch den Katheter zu spülen. Das letzte Mikroskopiebild der hier gezeigten Bilderfolge macht deutlich, wie die Körner durch das verwendete Leitungswasser aufquellen.

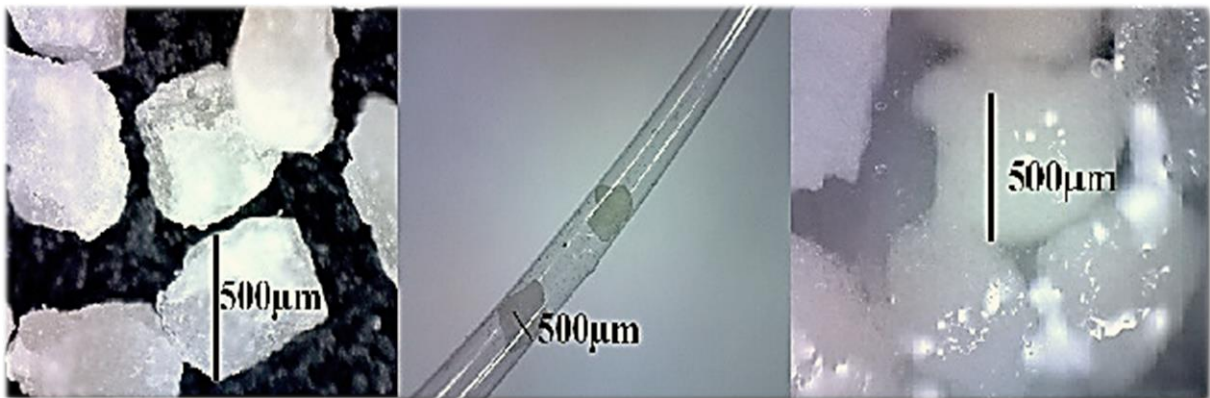


Abbildung 28: Weichweizengrieß (Feldmühle) vor, während und nach der Katheterpassage

4.1.3. Verhalten von Contour SE™ Microspheres bei der in vitro Untersuchung

Bei der Betrachtung der nativen Contour SE™ Microspheres fällt auf, dass einige der Embolisationspartikel schon vor dem Durchtritt durch den Katheter Läsionen in ihrer homogenen Morphe aufweisen. Die Katheterpassage an sich gestaltet sich unproblematisch, da die Embolisate mit einem Durchmesser von 300-500µm im Bereich des Durchmessers des Simulationskatheters liegen. Aufgrund der Vorschädigung der Contour SE™ Microspheres ist nicht zu beurteilen, ob und welche Veränderungen an dem Embolisationspartikeln durch Kontakt mit den Begrenzungen des gläsernen Katheters zustande gekommen sind.

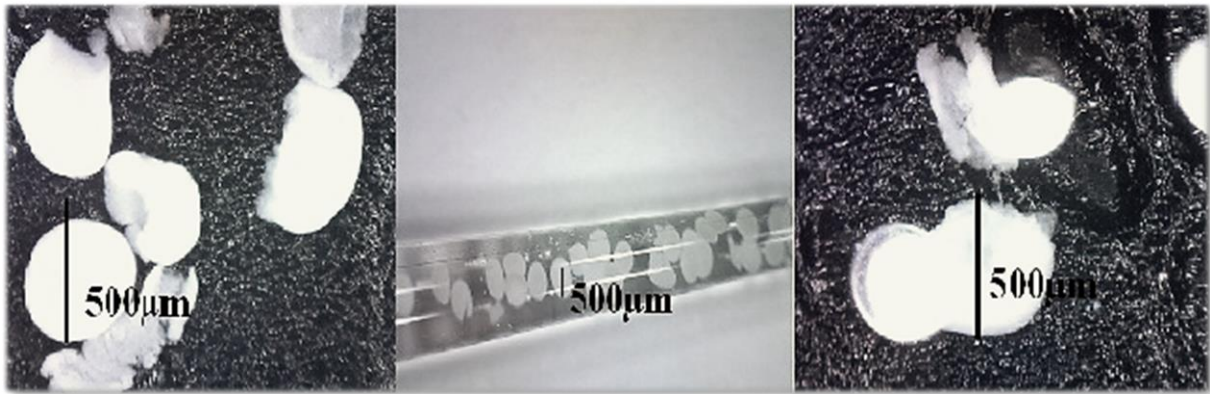


Abbildung 29: Contour SE™ Microspheres 300-500µm (Boston Scientific Corporation) vor, während und nach der Katheterpassage

4.1.4. Verhalten von Embosphere® Microspheres bei der in vitro Untersuchung

Die homogen kugeligen Embosphere® Microspheres lassen sich trotz ihres durchsichtigen Erscheinens gut darstellen und sind auch makroskopisch deutlich erkennbar. Obwohl der Partikeldurchmesser den Innendurchmesser des verwendeten Testkatheters übersteigt, ist die Passage problemlos möglich. Die dafür nötige morphologische Änderung der Sphären ist elastisch und vollständig reversibel.

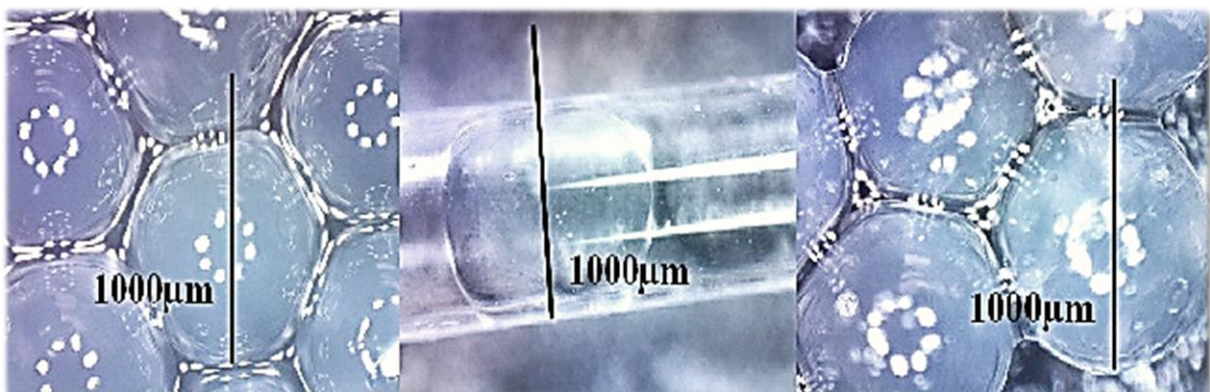


Abbildung 30: Embosphere® Microspheres 700-900µm (Merit Medical) vor, während und nach der Katheterpassage

4.1.5. Verhalten von Embozene™ Microspheres bei der in vitro Untersuchung

4.1.5.1. *Embozene™ Microspheres, Nenngröße 400µm*

Mit seinem Innendurchmesser von circa 355µm liegt der verwendete Simulationskatheter im empfohlenen Zielbereich des klinisch verwendeten Katheters. Die abgebildeten Mikroskopiebilder zeigen während Katheterpassage eine deutliche Abweichung von der kugeligen Morphologie, die aber vollständig reversibel ist, sobald die Embozene™ Microspheres den Katheter verlassen haben.

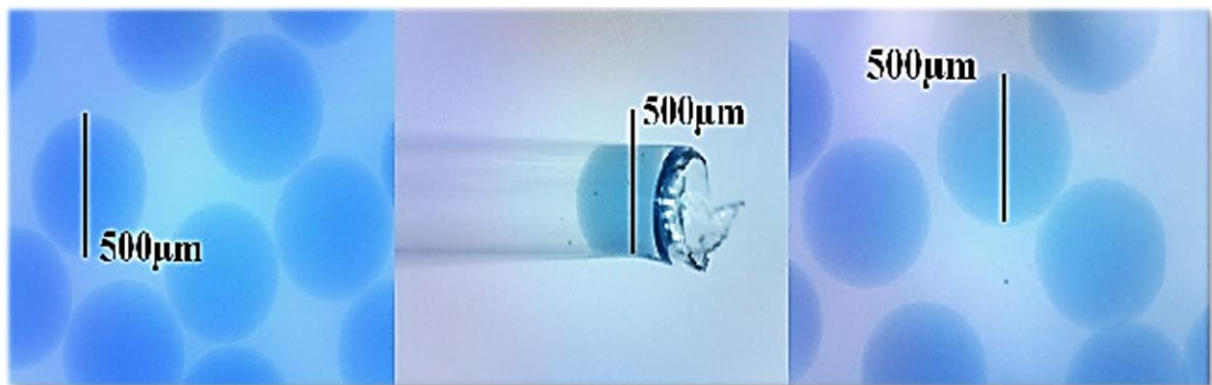


Abbildung 31: Embozene™ Microspheres 400µm (Celo®Nova BioSciences, Inc.) vor, während und nach der Katheterpassage

4.1.5.2. *Embozene™ Microspheres, Nenngröße 500µm*

Ähnlich den blaufarbigem Embozene™ Microspheres zeigen sich auch die Vertreter dieser Größenordnung als elastisch verformbare Sphären. Die Katheterpassage verläuft reibungslos und wird von den Embozene™ Microspheres ohne Läsionen überstanden.

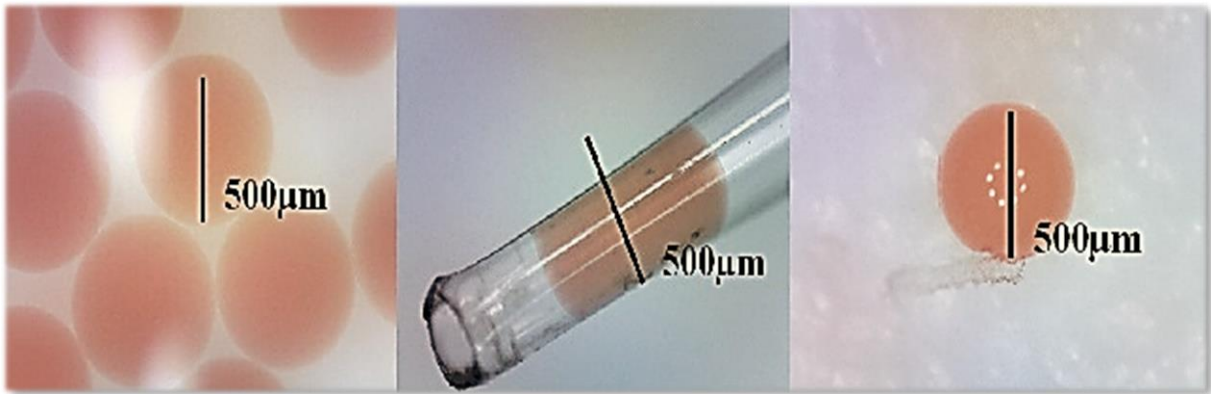


Abbildung 32: :Embozene™ Microspheres 500µm (Celo®Nova BioSciences,Inc.) vor, während und nach der Katheterpassage

4.1.5.3. *Embozene™ Microspheres, Nenngröße 1300µm*

Die Durchmesser der hier vorliegenden Embolisationspartikel und des gläsernen Simulationskatheters divergieren stark. Die Katheterpassage der Sphären ist nur unter Druckaufbau mittels Inflationsgerät möglich. Dies bedingt eine irreversible Schädigung der Partikel. Sie verlieren dabei zum Teil ihre scharfe, glatte Begrenzung, ihre sphärische Form oder zerreißen komplett.

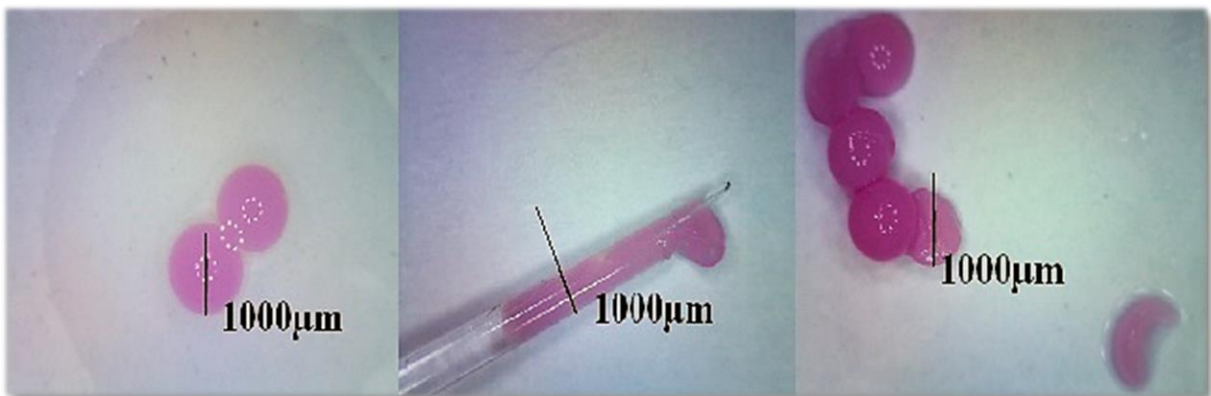


Abbildung 33: Embozene™ Microspheres 1300µm (Celo®Nova BioSciences,Inc.) vor, während und nach der Katheterpassage

4.1.6. Verhalten von DC Beads®- Partikel bei der in vitro Untersuchung

Die homogenen Sphären durchlaufen im nativen Zustand den Katheter ohne Probleme. Sie bleiben in ihrer Form und Größe konstant, es kommt zu keinerlei plastischen Änderungen.

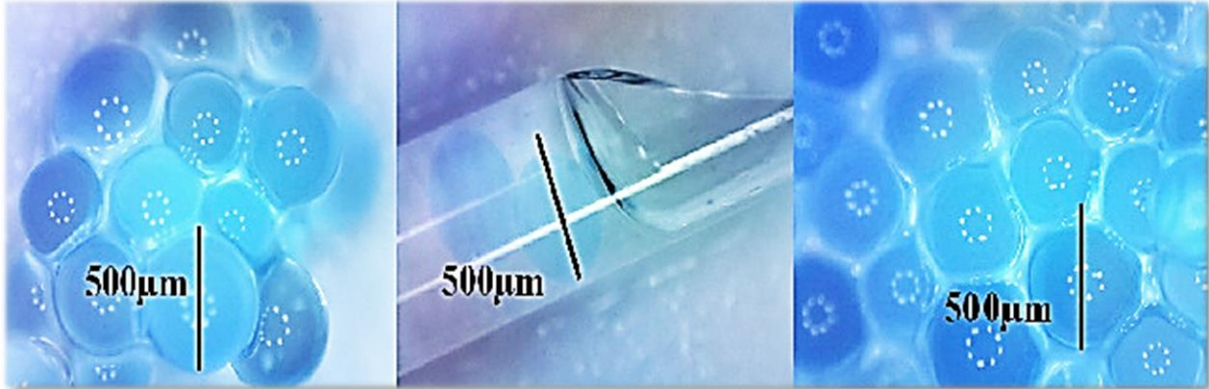


Abbildung 34: DC Beads® 300-500µm (Terumo, Biocompatibles) vor, während und nach der Katheterpassage

4.1.7. Verhalten von Embozene Tandem™ -Partikel bei der in vitro Untersuchung

Da die Partikel einen Durchmesser von circa 100µm aufweisen, kommt es hier zu keiner relevanten Beeinträchtigung der Partikelgestalt durch die Wände des Simulationskatheters. Eine mögliche Elastizität der Embozene Tandem™ kann hier nicht geprüft werden.

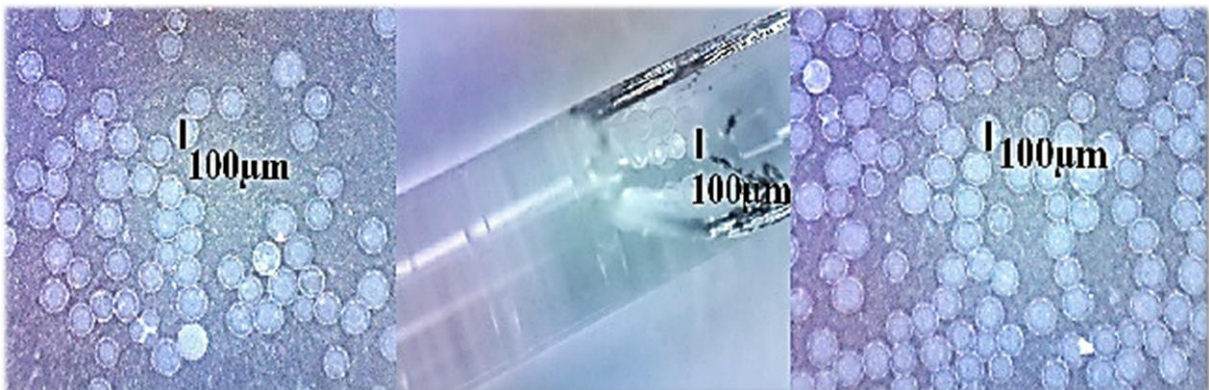


Abbildung 35: Embozene Tandem™ 100µm, (Celo®Nova BioSciences, Inc.) vor, während und nach der Katheterpassage

4.2. Beladung der Embolisationspartikel mit verschiedenen Zytostatika

Neben der morphologischen Variabilität von DC Beads® während des Beladungsvorganges wird auch deren Aufnahmevermögen für Zytostatika mittels Zeit-Dosis-Kurve und einer Berechnung der Ladungskapazität ermittelt. Außerdem veranschaulichen mikroskopische Bilder von Embozene Tandem™ deren medikamentöse Beladung und die damit einhergehende Größenvarianz.

4.2.1. Beladungsergebnisse der DC Beads® 300-500µm

4.2.1.1. Morphologische Variabilität der DC Beads® 300-500µm während des Beladungsvorganges mit Doxorubicin 2mg/ml

Aufgrund der Eigenfarben von DC Beads® und Doxorubicin gelingt deren bildliche Darstellung sehr gut. Die nativen, blauen Partikel zeigen eine homogen kugelige Struktur mit einem Durchmesser von circa 500µm. Nach fachgerechter Beladung mit rotem Doxorubicin nehmen die DC Beads® die kräftige Rotfärbung an. Morphologisch kann eine deutliche Verringerung des Durchmessers auf circa 300µm bei gleichzeitigem Erhalt der sphärischen Struktur beobachtet werden.

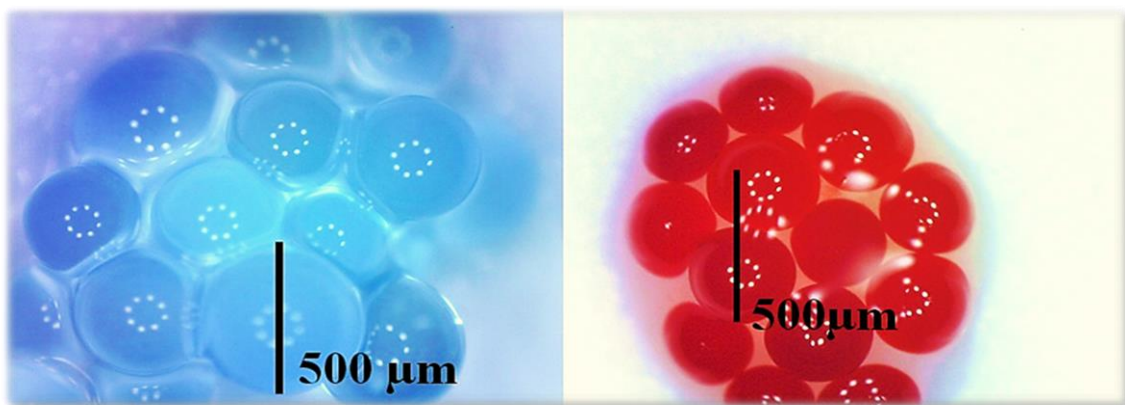


Abbildung 36: links: DC Beads® nativ, rechts: DC Beads® beladen mit Doxorubicin 2mg/ml

4.2.1.2. Ermittlung einer Zeit-Dosis –Kurve für die Beladung der DC Beads® 300-500µm mit Epirubicin 5mg/ml

Nach der oben beschriebenen Anleitung zur Methodik dieses Experimentes wurde mit Epirubicin 5mg/ml verfahren. Die tabellarisch aufgezeichneten Versuchsergebnisse werden anschließend in eine Graphik umgesetzt.

Zeit in Minuten nach Start der Beladung von DC Beads® mit Epirubicin 5mg/ml	Gemessene Extinktion
0	2055
1	2048
2	2044
3	2042
4	2017
5	1950
7,5	1901
10	1898
15	1823
20	1798

Tabelle 5: zeitabhängige Extinktionswerte der Messflüssigkeit während der Beladung von DC Beads® mit Epirubicin 5mg/ml

Mit Hilfe des nachfolgenden Diagramms können die Ergebnisse des Experimentes als Zeit-Dosis – Kurve quantifiziert werden. Es zeigen sich sinkenden Werte für die Epirubicin-Extinktion in den ersten 20 Minuten des Beladungsvorganges. Dies entspricht dem makroskopisch sichtbaren Verlauf des Experimentes. Die Farbintensität der Medikamentenlösung wird aufgrund der Diffusion in die DC Beads® zunehmend schwächer. So können die abnehmenden Werte der gemessenen Extinktion als Zeichen einer erfolgreichen Beladung der Partikel gewertet werden. Insgesamt zeigt sich ein weitestgehend homogener Verlauf über den beobachteten Versuchszeitraum.

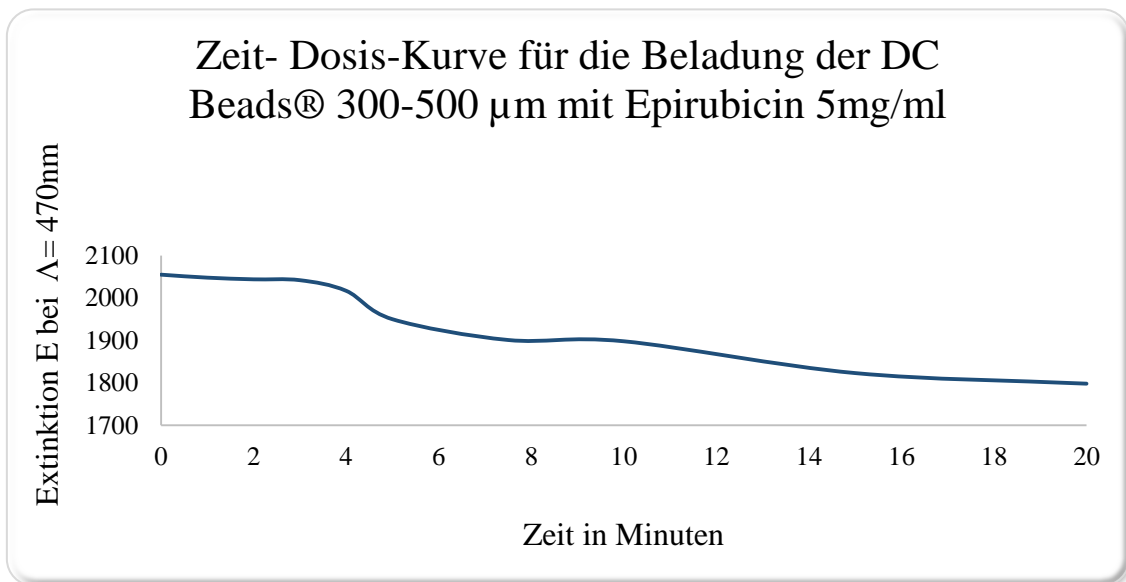


Abbildung 37: Zeit-Dosis – Kurve für die Beladung von DC Beads®300- 500µm mit Epirubicin 5mg/ml

Ein zeitlicher Vorhersagewert, wann bei diesem Experiment eine 98%ige Beladung der Partikel erreicht wäre, ist damit allerdings nicht möglich. Es handelt sich lediglich um eine Veranschaulichung der Medikamentenaufnahme in den ersten 20 Minuten der Beladung. Außerdem lässt sich kein Vergleich zu den vom Hersteller angegebenen Aufnahmezeiten der DEBDOX™ durchführen, da diese mit anderen Zytostatikakonzentrationen arbeiten.

4.2.1.3. Ermittlung der Ladungskapazität der DC Beads® 300-500µm für Doxorubicin 2mg/ml

Die Ergebnispräsentation zur Ermittlung einer Ladungskapazität von DC Beads® für Doxorubicin- Lösung 2mg/ml gliedert sich in zwei Abschnitte. Zunächst wird der experimentelle Teil als Grundlage der Berechnungen im zweiten Teil dargestellt.

Experimenteller Teil:

Doxorubicin- Stammlösung: 2mg/ml

Verwendete Menge der Stammlösung: 0,5 ml

Konzentration der verwendeten Stammlösung: 1mg /0,5ml

Verdünnung Doxorubicin: 0,5 ml Stammlösung : 10 ml 0,9% NaCl = 1:20

Extinktion der 1: 20 Verdünnungsstufe – Doxorubicin- Stammlösung: 1268

Verdünnung des Doxorubicin -Überstandes nach Beladung der DC Beads®:

0,5ml Doxorubicin- Überstand: 10 ml 0,9% NaCl = 1:20

Extinktion der 1: 20 Verdünnungsstufe- Doxorubicin- Überstand: 650

Rechnerischer Teil:

Verdünnung Doxorubicin – Stammlösung:

1: 20 = 0,5 ml Stammlösung (enthalten 1mg Doxorubicin) in 10 ml 0,9% NaCl

Extinktion der 1:20 Verdünnungsstufe-Doxorubicin- Stammlösung: 1268

Extinktion der 1: 20 Verdünnungsstufe- Doxorubicin- Überstand: 650

Ergebnis: Die Extinktion von 1268 der verdünnten Stammlösung sinkt nach vollständigem Beladen der DC Beads® auf einen Extinktionswert von 650, gemessen im Überstand der gleichen Verdünnungsstufe. Es wurde also lediglich ein Doxorubicingehalt der Extinktion 1268- 650 = 618 von den DC Beads® aufgenommen.

Laut Herstellerangabe gilt für die DEBDOX™ bei regelhafter Beladung:

Doxorubicin - Stammlösung: 2 mg/ml

Menge der verwendeten Stammlösung: 3x 12,5ml = 37,5 ml

Konzentration der verwendeten Stammlösung für eine DC Bead® - 2ml Ampulle:

$37,5 \text{ ml} \times 2 \text{ mg/ml} = 75 \text{ mg Doxorubicin} / 2 \text{ ml DC Beads®} = 37,5 \text{ mg/ml}$

⇒ Bei 100%iger Aufnahme des Doxorubicins in die DC Beads® sollen diese laut Hersteller also eine Zytostatikakonzentration von 37,5mg/ml enthalten

Laut Ergebnis dieses Experimentes gilt für die DEBDOX™:

1:20 Verdünnung:

1268 \approx 1mg Doxorubicin

650 \approx 0,51 mg Doxorubicin

⇒ 49% der Zytostatikastammlösung werden von den DC Beads® aufgenommen

Ohne Verdünnung:

Doxorubicin - Stammlösung: 2 mg/ml

Menge der verwendeten Stammlösung: 3x 12,5ml = 37,5 ml

Konzentration der verwendeten Stammlösung für eine DC Bead® - 2ml Ampulle:

$0,49 \times 37,5 \text{ ml} \times 2 \text{ mg/ml} = 0,49 \times 75 \text{ mg Doxorubicin} / 2 \text{ ml DC Beads®} = 0,49 \times 37,5 \text{ mg/ml}$
 $= 18,375 \text{ mg/ml}$

⇒ Bei 49%iger Aufnahme des Doxorubicins in die DC Beads® enthalten diese lediglich eine Zytostatikakonzentration von 18,375mg/ml

Die vom Hersteller angegebene 98%ige Beladung innerhalb von 90 Minuten (Doxorubicin – Pulver 25mg/ml) bzw. 14 Stunden (Doxorubicin- Lösung 2mg/ml) bezieht sich dabei möglicherweise auf die potentielle Aufnahmekapazität der DC Beads® und nicht auf die Reduktion der Zytostatika-Stammlösung.

4.2.2. Beladungsergebnisse der Embozene Tandem™ 100µm

4.2.2.1. *Morphologische Variabilität der Embozene Tandem™ 100µm während des Beladungsvorganges mit Epirubicin 25mg/ml*

Das linke Bild stellt die Embozene Tandem™- Partikel in ihrem nativen Zustand mikroskopisch dar. Die rechte Abbildung zeigt die Sphären nach deren Beladung mit Epirubicin 25mg/ml. Deutlich erkennbar ist die Farbänderung der Embolisationspartikel, welche durch die Aufnahme des roten Zytostatikums zustande kommt. Während des Beladungsvorganges ändert sich deren Durchmesser nicht wesentlich, sodass weitestgehend von einer Größenkonstanz ausgegangen werden kann.

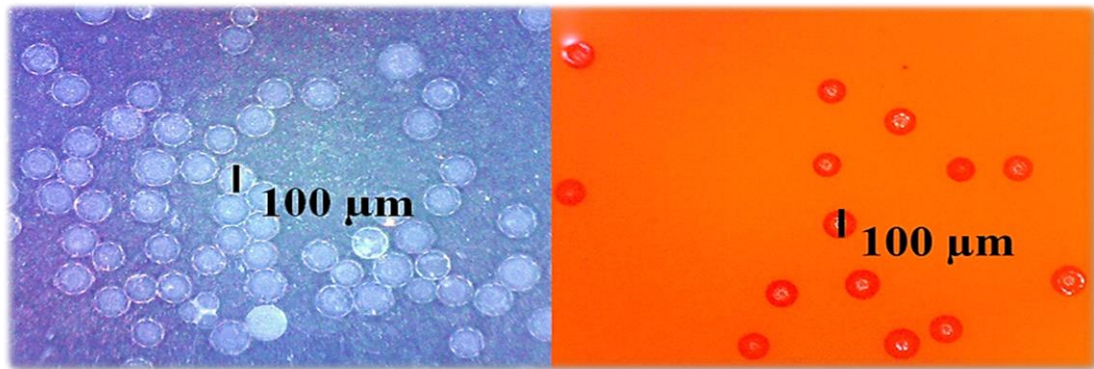


Abbildung 38: links: Embozene Tandem™ nativ, rechts: Embozene Tandem™ beladen mit Epirubicin 25mg/ml

Eine weitere mikroskopische Aufnahme des Beladungsvorganges liefert die folgende Abbildung. Der zeitliche Verlauf des Medikamententransfers aus der Stammlösung in die Sphären ist damit gut darzustellen. Das erste mikroskopische Bild (Abbildung 39, links) wurde 15 Minuten nach dem Start des Beladungsvorganges aufgenommen, das zweite Bild (Abbildung 39, rechts) 60 Minuten nach Beladungsstart mit Epirubicin 25mg/ml. Es zeigt sich, dass die Stammlösung ihre starke Rotfärbung zunehmend verliert, während sich die Partikel selbst intensiver färben.

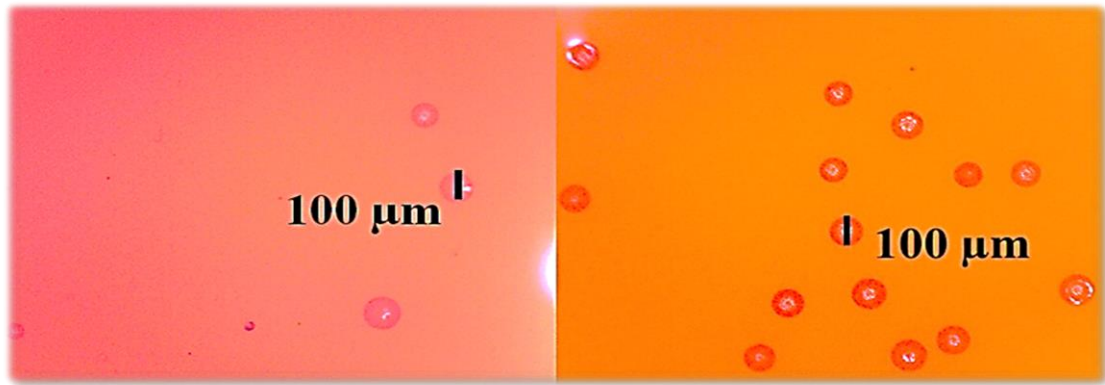


Abbildung 39: links: Embozene Tandem™ 15min nach Erstkontakt mit Epirubicin 25mg/ml, rechts: Embozene Tandem 60 min nach Erstkontakt mit Epirubicin 25mg/ml

4.3. Vergleichende Betrachtung der Elution verschiedener Drug-Eluting Beads bei 37°C in vitro

Die photometrisch gemessenen Werte werden zunächst tabellarisch aufgelistet. Anschließend erfolgt eine graphische Darstellung der Ergebnisse in Abhängigkeit von der Zeit. Die so erhobene Elutionskurve beschreibt die Kinetik der Medikamentenabgabe verschiedener Drug-Delivery Beads.

4.3.1. Elution von Doxorubicin – Lösung 2mg/ml und rekonstituiertem Doxorubicin 25mg/ml aus DC Beads® 300-500µm im offenen System

4.3.1.1. Auswertung der Messergebnisse mit Ermittlung der Elutionskurve

Die über die gesamte Versuchsdauer von 242 Stunden photometrisch gemessenen Werte sind in der nachfolgenden Tabelle abhängig von der Zeit zusammengestellt.

Zeit in Stunden nach Elutionsbeginn	Extinktion der DC Beads® beladen mit Doxorubicin-Lösung 2mg/ml ($\lambda = 470\text{nm}$)	Extinktion der DC Beads® beladen mit Doxorubicin-Pulver 25mg/ml ($\lambda = 470\text{nm}$)
1	509	551
2	600	610
3	631	635
4	621	621
5	606	596
6	592	581
7	586	578
8	570	575
9	546	611
10	545	623
11	542	620

Zeit in Stunden nach Elutionsbeginn	Extinktion im offenen System der DC Beads® beladen mit Doxorubicin- Lösung 2mg/ml ($\Lambda = 470\text{nm}$)	Extinktion im offenen System der DC Beads® beladen mit Doxorubicin- Pulver 25mg/ml ($\Lambda = 470\text{nm}$)
12	533	618
13	529	605
14	526	596
15	510	595
16	498	587
17	489	580
18	475	577
22	553	576
26	532	550
30	499	520
34	468	493
38	417	489
42	373	477
46	325	467
50	286	496
74	282	362
98	234	403
122	136	308
146	98	193
170	113	179
194	68	92
218	50	54
242	44	42

Tabelle 6: Extinktionen der Messflüssigkeiten bei der Elution von Doxorubicin- Lösung 2mg/ml und rekonstituiertem Doxorubicin 25mg/ml aus DC Beads® 300-500µm im offenen System

Die graphische Darstellung der erhobenen Werte liefert die Elutionskurven. So gelingt es, für die DC Beads® eine vergleichende Betrachtung der Elution von Doxorubicin- Lösung 2mg/ml und Doxorubicin- Pulver 25mg/ml über einen Zeitraum von etwa zehn Tagen zu schaffen.

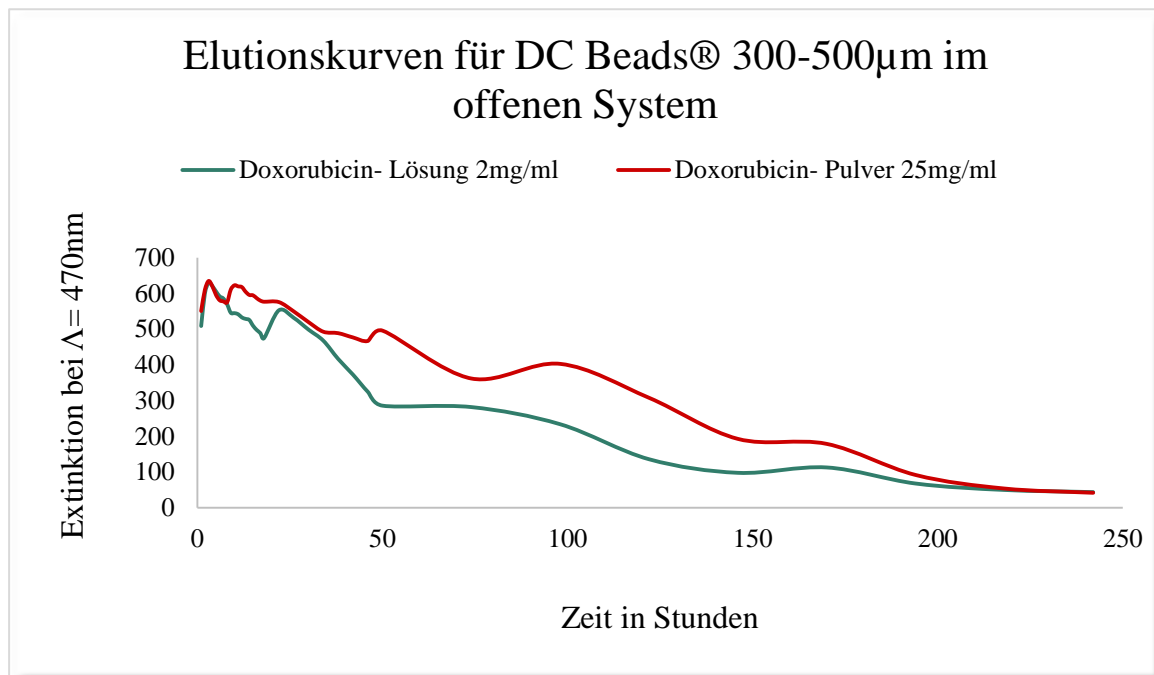


Abbildung 40: Elutionskurve für DC Beads® im offenen System

Da es sich bei dem Versuchsaufbau um ein offenes System handelt, können die einzelnen Messwerte als Elutionswerte des vorangegangenen Zeitintervalls betrachtet werden. Diese Zeitintervalle variieren zwischen einer und 24 Stunden, sodass die Messwerte stets Mittelwerte darstellen.

Anfänglich weisen die beiden Elutionskurven einen sehr ähnlichen Verlauf auf: In den ersten drei Stunden steigert sich die Medikamentenabgabe bis zum Zenitwert, der nahezu identische Werte in beiden Kurven liefert. Dies stimmt überein mit der makroskopisch deutlich sichtbaren Rotfärbung der Messflüssigkeiten. Über die nächsten zehn Tage nimmt die Elution der DC Beads® kontinuierlich ab. Auch hierbei liefern die beiden Kurven vergleichbare Werte. Nach circa einer Woche bewegen sich sämtliche Elutionswerte nur noch auf geringen Niveau. Das Experiment zur Kinetik der Elution zeigt also, dass die DC Beads® über einen Zeitraum von zehn Tagen deutliche Mengen an Doxorubicin eluieren, zunächst mit einer steigenden, dann mit einer fallenden Tendenz. Diese Dynamik scheint weitestgehend unabhängig von der Konzentration der Zytostatikasubstanz zu sein, mit der sie initial beladen werden. Die Kurven für Doxorubicin- Lösung 2mg/ml und Doxorubicin – Pulver 25mg/ml zeigen nicht nur einen sehr ähnlichen Verlauf, sondern auch fast identische Werte zu Beginn und am Ende der

Versuchsdauer. Bekannt ist, dass die DC Beads® über den Mechanismus des Ionenaustausches mit dem Zytostatikum interagieren [83], sowohl bei deren Beladung, als auch bei deren Elution. Die Konzentration des Doxorubicins scheint dabei nur eine geringe Rolle zu spielen. Das bedeutet, dass die Elution der DC Beads® nach den Ergebnissen dieses in vitro Experimentes weitestgehend unabhängig von der Doxorubicinkonzentration der Beladungssubstanz ist und allenfalls streckenweise kleinere Varianzen aufweist, bei denen die mit Doxorubicin- Pulver beladenen DC Beads® eine stärkere Elution aufweisen.

4.3.2. Elution von Epirubicin 25mg/ml aus DC Beads® 300-500µm und Embozene Tandem™ 100µm im geschlossenen System

4.3.2.1. *Auswertung der Messergebnisse mit Ermittlung der Elutionskurve*

Folgende Tabelle listet die Messergebnisse der Elutionskinetik beider Kreisläufe in Abhängigkeit von der Zeit auf.

Zeit in Stunden nach Elutionsbeginn	Extinktion im Kreislauf der DC Beads® beladen mit Epirubicin 25mg/ml ($\Lambda = 470\text{nm}$)	Extinktion im Kreislauf der Embozene Tandem™ beladen mit Epirubicin 25mg/ml ($\Lambda = 470\text{nm}$)
0,16	7	1
0,5	30	3
1	41	17
1,5	56	43
2	77	40
2,5	127	58
3	130	87
3,25	139	91
5,75	215	137
6,25	227	139

Zeit in Stunden nach Elutionsbeginn	Extinktion im Kreislauf der DC Beads® beladen mit Epirubicin 25mg/ml ($\Lambda = 470\text{nm}$)	Extinktion im Kreislauf der Embozene Tandem™ beladen mit Epirubicin 25mg/ml ($\Lambda = 470\text{nm}$)
6,5	229	139
7	244	146
7,5	249	151
8	254	144
8,5	277	142
9,5	298	154
10	305	155
10,5	311	155
11	318	157
11,5	327	160
12	331	159
12,5	336	160
13	342	162
14	354	162
15	362	163
16	369	162
18,75	379	179
19,75	379	159
21,5	387	154
22,75	397	150
24	394	144
25,5	401	145
26,5	410	142
28	409	137
29,5	416	136
31	414	134
32,5	420	133
33	415	130
41	425	121
45	427	112

Zeit in Stunden nach Elutionsbeginn	Extinktion im Kreislauf der DC Beads® beladen mit Epirubicin 25mg/ml ($\Lambda = 470\text{nm}$)	Extinktion im Kreislauf der Embozene Tandem™ beladen mit Epirubicin 25mg/ml ($\Lambda = 470\text{nm}$)
49	430	112
53	434	113
54,5	435	113
64,75	438	104
66,25	441	104
87	441	97
98	440	95
111	438	91
119	427	94
135	466	91
139	405	87
139	368	45
143	378	52
159	362	50
165	360	48

Tabelle 7: Elutionswerte der Messflüssigkeiten bei der Elution von Epirubicin 25mg/ml aus DC Beads® 300-500µm und Embozene Tandem™ 100µm im geschlossenen System

Die Testergebnisse werden in eine Graphik übertragen. Die Elutionskinetik der DC Beads® und Embozene Tandem™ können so gut verglichen werden.

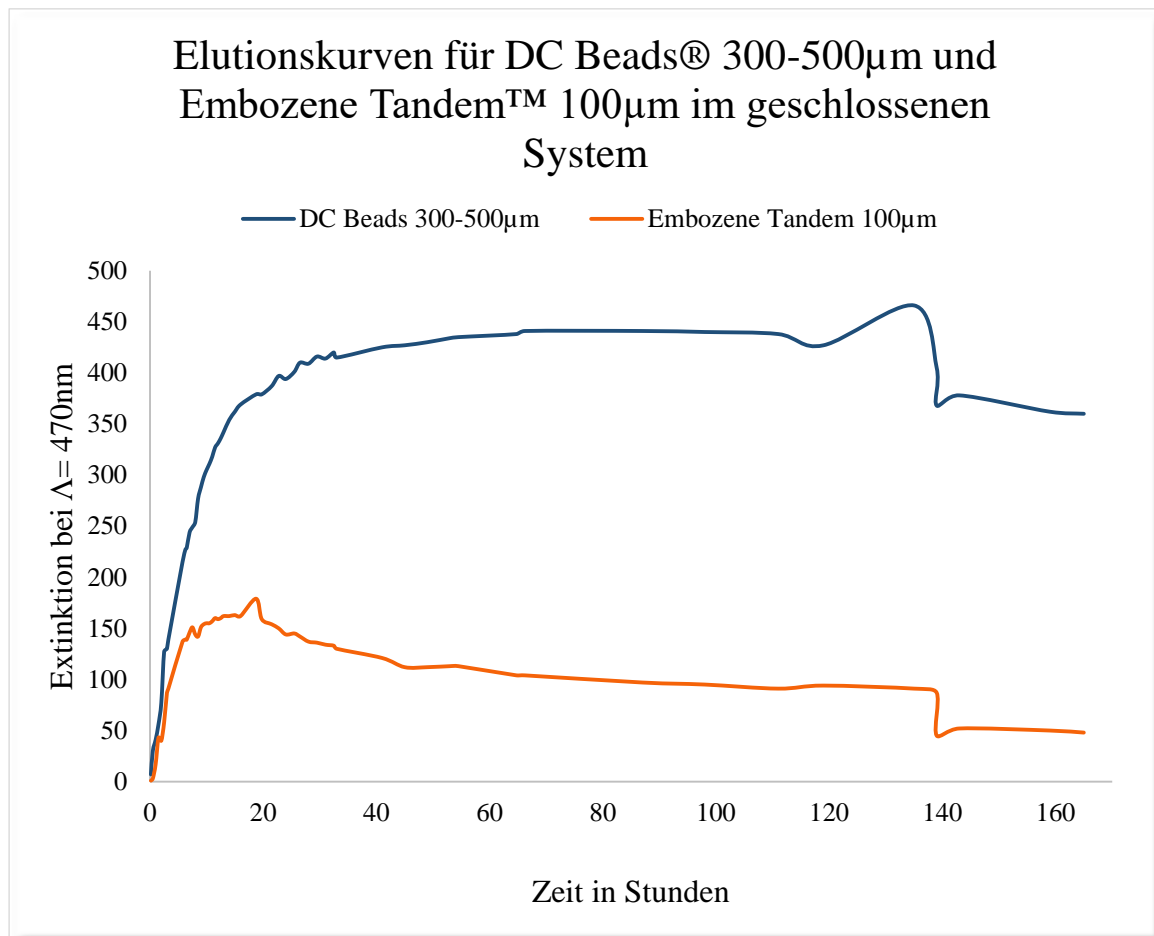


Abbildung 41: Elutionskurve für DC Beads® und Embozene Tandem™ im geschlossenen System

Da es sich bei diesem Versuch um ein geschlossenes Testsystem handelt, bleibt das zirkulierende Medium quantitativ stets dasselbe, ändert sich aber qualitativ durch den zunehmenden Epirubicingehalt. Die gemessenen Extinktionen sind als Mittelwerte des kompletten Kreislaufes aufzufassen.

In den ersten Stunden des in vitro Experimentes kann in beiden Testkreisläufen eine Steigerung der Elutionswerte registriert werden. Für die DC Beads® lässt sich ein steiler Kurvenanstieg in den ersten 45 Stunden nach Applikation verzeichnen. In diesem Zeitraum eluieren die DC Beads® das Zytostatikum intensiv. Die Embozene Tandem™ haben schon nach circa 18 Stunden den Höchstwert der Elution erreicht. Auffällig dabei ist, dass die erreichten Maximalwerte stark variieren. Das Eluat der DC Beads® ist deutlich höher konzentriert als das der Embozene Tandem™. In den folgenden Stunden des Experimentes pendeln sich die Elutionswerte der DC Beads® auf stabilen Niveau ein. Der Epirubicingehalt der

Messflüssigkeit ändert sich in dieser Zeit nicht wesentlich. Der Kurvenverlauf der Embozene Tandem™ hingegen zeigt nach Erreichen des Zenitwertes eine leicht fallende Tendenz. Dies lässt darauf schließen, dass sich der Epirubicin Gehalt der Messflüssigkeit verringert. Als mögliche Ursache hierfür ist eine erneute Aufnahme des Zytostatikums in die Embozene Tandem™ anzunehmen. Im Verlauf pendeln sich auch die gemessenen Extinktionen für die Elution der Embozene Tandem™ auf stabilem Niveau ein.

Zusammenfassend zeigen sich also einige Varianzen der Elutionskinetik von DC Beads® und Embozene Tandem™. Zum einen macht der jeweilige Zenitwert der Elutionskurven deutlich, dass die DC Beads® das Epirubicin über einen wesentlich längeren Zeitraum hinweg abgeben als die Embozene Tandem™. Zum anderen werden bei den DC Beads® höhere Medikamentenkonzentrationen des Eluates registriert. Eine erneute Abnahme der gemessenen Extinktionswerte lässt sich lediglich bei den Embozene Tandem™ feststellen.

4.3.3. Elution von Mitoxantron 2mg/ml aus DC Beads® 300-500µm und Embozene Tandem™ 100µm im offenen System

4.3.3.1. Auswertung der Messergebnisse mit Ermittlung der Elutionskurve

Nachfolgende Tabelle enthält die gemessenen Wertepaare des gesamten Versuchsablaufs von 166,5 Stunden.

Zeit in Stunden nach Elutionsbeginn	Extinktion im offenen System der DC Beads® beladen mit Mitoxantron 2mg/ml ($\lambda = 660\text{nm}$)- Mittelwerte ab Stunde 71	Extinktion im offenen System der Embozene Tandem™ beladen mit Mitoxantron 2mg/ml ($\lambda = 660\text{nm}$)- Mittelwerte ab Stunde 71
1	153	12
2	52	2
3	36	10
4	36	2

Zeit in Stunden nach Elutionsbeginn	Extinktion im offenen System der DC Beads® beladen mit Mitoxantron 2mg/ml (Λ = 660nm)- Mittelwerte ab Stunde 71	Extinktion im offenen System der Embozene Tandem™ beladen mit Mitoxantron 2mg/ml (Λ =660nm)- Mittelwerte ab Stunde 71
5	32	8
6	31	2
7	27	12
8	27	13
9	37	12
10	33	15
11	22	12
12	31	9
13	32	19
14	31	7
15	36	10
17	24	11
19	22	18
21	33	14
23	31	19
25	34	5
29	36	18
33	31	16
39	21	17
47	18	4
71	33,8	20
95,5	26,25	8,5
119	29,25	13,25
143	31,75	7,75
166,5	25,5	8

Tabelle 8: Elutionswerte der Messflüssigkeiten bei der Elution von Mitoxantron 2mg/ml aus DC Beads® 300-500m und Embozene Tandem™ 100µm im offenen System

Die graphische Darstellung der Ergebnisse liefert die Elutionskurven von DC Beads® und Embozene Tandem™ für Mitoxantron im offenen Testsystem.

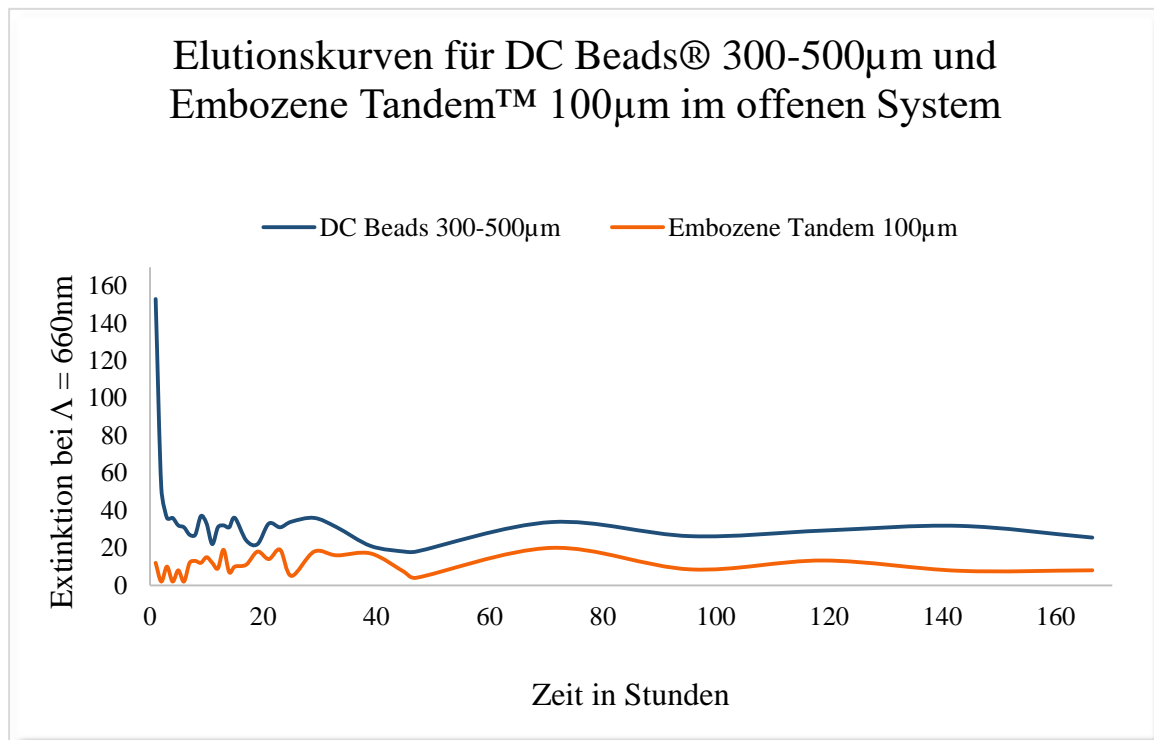


Abbildung 42: Elutionskurven für DC Beads® und Embozene Tandem™ im offenen System

Bei der Betrachtung der erhobenen Messwerte ist zu beachten, dass es sich dabei jeweils um Mittelwerte bestimmter Zeitintervalle handelt. Die DC Beads® eluieren zu Beginn des Experimentes zunächst hohe Konzentrationen Mitoxantron. Ihre Elution scheint unmittelbar nach Applikation am stärksten zu sein. Bereits im Verlauf der ersten Stunden sind jedoch deutlich sinkende Messwerte zu verzeichnen. Die Embozene Tandem™ hingegen weisen von Beginn an näherungsweise gleichbleibend niedrige Elutionswerte auf. Im Gegensatz zu den DC Beads® ist hier also nicht mit wesentlichen Konzentrationsschwankungen des Zytostatikums im umgebenden Medium zu rechnen. Über die verbleibende Versuchsdauer von etwa einer Woche zeigen sich die beiden Kurvenverläufe auf weitestgehend konstantem Niveau. Da sich nach einer Woche Versuchsdauer die Elutionswerte nicht wesentlich verändern, wird dieses Experiment nach 166,5 Versuchsstunden beendet.

Zusammenfassend zeigt sich in diesem in vitro Experiment, dass die DC Beads® vor allem unmittelbar nach der Applikation, aber auch im gesamten Verlauf konstant höhere Mitoxantronkonzentrationen im Eluat erzeugen als die Embozene Tandem™. Letztere hingegen weisen das homogenere Muster der Elutionskinetik auf.

5. Diskussion

Die transarterielle Embolisation ist ein endovaskuläres Therapieverfahren, welches einen partiellen oder vollständigen Gefäßverschluss zum Ziel hat. Als transarterielle Chemoembolisation (TACE) wird es vor allem zur Therapie primärer und sekundärer Lebermalignome eingesetzt [19]. Diese Arbeit beschäftigt sich mit einer experimentellen in vitro Analyse physikalischer Charakteristika verschiedener partikulärer Embolisate sowie dem pharmakodynamischen Profil ausgewählter Drug- Eluting Beads.

Um die morphologischen Eigenschaften partikulärer Embolisate zu analysieren, wird in dieser Arbeit das Prinzip der Mikroskopie eines in vitro gläsernen Simulationskatheters angewandt. Ebert et al. gelang es 2013 mittels intravitaler Mikroskopie stärkehaltige Embolisate in ihren okkludierenden Eigenschaften darzustellen [26]. In der hier vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass die Embosphere® Microspheres, Embozene™ Microspheres 400µm, Embozene™ Microspheres 500µm und DC Beads® 300-500µm zumindest bis zu dem Durchmesser von 0.014 inch (circa 355µm) des gläsernen Testkatheters reversibel verformbar sind. Aus der Arbeit von Namur et al. ist bekannt, dass DC Beads® der Größe 100-300µm in erster Linie Blutgefäße mit Durchmesser $237 \pm 135 \mu\text{m}$ okkludieren [22]. Obwohl sich die Durchmesser von Partikel und Blutgefäß ähneln, sind gewisse elastisch kompressible Eigenschaften der DC Beads® dafür nötig. Ein Forschungsergebnis, welches kongruent mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnissen zu den morphologischen Eigenschaften der DC Beads® ist. So kann begründet die Vermutung angestellt werden, dass sämtliche in vitro elastisch verformbaren Embolisationspartikel auch in vivo diese Eigenschaften beibehalten und somit in der Lage sind, Blutgefäße mit geringem Durchmesser zweckgemäß im Sinne der transarteriellen Chemoembolisation zu okkludieren. Dennoch ist bei all den Vorteilen einer reversiblen Kompressibilität oben genannter Embolisate zu bedenken, dass diese Eigenschaften eine potentielle Limitierung der angiographischen Bildqualität darstellen. So ist es denkbar, dass die angiographische in vivo Bildkontrolle der TACE weniger eindeutig ausfällt, da die Embolisate in dem geringen Durchmesser der Zielgefäße ihre typische homogene Kugelgestalt einbüßen und die so entstandene heterogene Zielstruktur unschärfer beurteilbar ist. Außerdem ist es denkbar, dass die verformbaren Partikel durch morphologische Gestaltänderung einige Minuten nach der in vivo Applikation in weiter peripher gelegene Gefäße vorrücken. Dies lässt eine erneute Embolisation möglicherweise nötig werden.

Nach den hier vorliegenden Ergebnissen ist bei den Embozene™ Microspheres 1300µm hingegen eine Kompression auf den genannten Durchmesser von 0.014 inch nicht ohne die

irreversible Läsion der Partikel möglich. Sollten sich durch eine ungeeignete Katheterauswahl die in vivo Verhältnisse für die Embozene™ Microspheres 1300µm in ähnlicher Form gestalten wie in diesem in vitro Experiment, so ist damit zu rechnen, dass eine gezielte Applikation, welche in den Qualitätskriterien der superselektiven TACE impliziert ist, aufgrund des hohen aufgetragenen Druckes nicht sicher zu gewährleisten ist und vielmehr dem Prinzip des „loss of resistance“ folgt. Im Weiteren muss differenziert betrachtet werden, in wie weit die Embolise im Fall der irreversiblen Schädigung durch die Katheterpassage noch die zu erwartenden okkludierenden Eigenschaften aufbringen können. Diese Überlegungen gelten eher als hypothetische Erwägung, da Partikel dieser Größenordnung in der Regel durch dickere Katheter appliziert werden. Da die Embozene Tandem™ (100µm) im Nativzustand einen Durchmesser kleiner als 0.014inch besitzen, ist die von Hersteller vorausgesagte Toleranz gegenüber einer zeitlich begrenzten Kompression des Materials im in vitro Experiment nicht beurteilbar. Eine ähnliche Limitierung ergibt sich für die EmboCept®-Partikeln mit einer Größe von 50-100µm. Außerdem gibt es Embolise, welche bereits vor Katheterpassage eine heterogene Struktur oder sogar Beschädigungen aufweisen. Dies ist vor allem bei den Contour SE™ Microspheres der Fall. Es ist keine sichere Zuordnung möglich, welche Läsion bereits vorbestehend und welche Läsion durch die Katheterpassage zustande gekommen ist. Allenfalls lässt sich aussagen, dass es sich bei diesem Embolisat offensichtlich auch ohne äußere Provokationsfaktoren um morphologisch instabile Partikel handelt. Trotz der mittlerweile mehrjährigen Erfahrung mit diesem Therapieregime, gibt es bis zum heutigen Zeitpunkt kein einheitliches Vorgehen, welches die technischen Details dieser Intervention zweifelsfrei regelt [45]. Dies betrifft auch die Katheterauswahl. Zwar gibt der Hersteller für die jeweiligen Embolise Empfehlungen zum gewählten Durchmesser der Katheter, eine Leitlinie für die TACE existiert bisher jedoch nicht. So ist es letztlich individuelle Ermessenssache des interventionellen Radiologen, den Katheterdurchmesser so zu wählen, dass die Größenverhältnisse von Partikel und Katheter kompatibel sind. Zum einen soll der gewählte Katheterdurchmesser möglichst gering ausfallen, um die traumatischen Folgen der Therapie einzuschränken, zum anderen groß genug sein, um eine irreversible Läsion der Embolise bedingt durch übermäßige Kompression oder eine ungenaue Applikation durch unkontrollierbare Druckverhältnisse während der Katheterpassage zu verhindern. Können die Kriterien zur geeigneten Katheterauswahl eingehalten werden, darf zumindest bei den elastisch verformbaren Embolisationspartikeln von qualitativ hochwertigen Okklusionseigenschaften auch in vivo ausgegangen werden, da die Embolise neben der elastischen Verformung im Katheter auch eine elastische Verformung in der Tumorarterie und damit in deren Summe eine Okklusion der Tumorarterie erreichen können. Bei all den stattgefunden Experimenten und

erlangten Erkenntnissen über die morphologische Variabilität der Embolisate, bleibt es für die Zukunft nicht aus, weitere Testverfahren zu dieser Thematik zu gestalten. Insbesondere ist es vonnöten, das morphologische Verhalten in Verbindung mit dem im klinischen Alltag verwendeten Kontrastmittel zu erforschen, um somit letztlich weitere Qualitätskriterien für die TACE zu definieren.

Eine morphologische Beschreibung von DC Beads® und Embozene Tandem™ während des Beladungsvorganges erfolgt ebenfalls mittels mikroskopischer Aufnahmen. Die Embozene Tandem™ erweisen sich dabei als größen- und formstabil bei circa 100µm. Ein Ergebnis, welches sich mit den Herstellerangaben der Firma Celo®Nova BioSciences, Inc. deckt, die einen Größenverlust kleiner 5% durch die Beladung angeben. Dies bietet im klinischen Alltag eine Erleichterung bei der geeigneten Katheterauswahl, da keine gravierenden morphologischen Veränderungen der Embolisate durch den Beladungsvorgang zu erwarten sind. Andererseits ist zu beachten, dass Partikel dieser Größenordnung ein gewisses Risikopotential für unbeabsichtigte Ischämien durch den Verschluss paratumoröser Gefäße bieten. Mehrere Studien versuchen Erkenntnisse über die ideale Partikelgröße zu erlangen. So ist bekannt, dass kleinere Partikel (100-300µm) direkt im Tumorgewebe hängen bleiben, wohingegen größere Beads (300-500µm) außerhalb des Tumors verbleiben [89] beziehungsweise kleine Partikel (70-150µm) im Vergleich zu größeren Vertretern (100-300µm) in weiter distal gelegene Regionen des Zielgewebes vordringen [86]. Tsochatzis et al. geben eine Empfehlung für die Verwendung möglichst kleiner Partikel, um eine selektive Okklusion kleiner tumorversorgender Arterien und weniger Nebenwirkungen zu erreichen [90]. Eine verminderte Komplikationsrate bei kleinen DC Beads® im Vergleich zu größeren DC Beads® besagt auch die Arbeit von Martin et al. [91]. DC Beads® der Größe 100-300µm schneiden bezüglich der Häufigkeit eines Postembolisationssyndroms und postinterventioneller Müdigkeit signifikant besser ab als DC Beads® der Größe 300-500µm ($p=0.011$, $p=0.025$) [92]. Im Gegensatz zu den Embozene Tandem™ erweisen sich die DC Beads® in den vorliegenden Versuchen als größenregredient durch den Beladungsvorgang mit Zytostatika. Eine solche Abnahme im Durchmesser der Partikel erklärt sich durch den sinkenden Wassergehalt der Embolisate im Austausch mit den Ionen des Zytostatikums und einer damit einhergehenden Zunahme elastischer Fähigkeiten [76, 83]. Dieses Ergebnis lässt klinisch relevante Fragestellungen aufkommen: Zum einen muss in Erwägung gezogen werden, dass die Änderung der Morphologie und Elastizität möglicherweise auch Einfluss auf den okkludierenden Charakter der Partikel ausübt. Zum anderen kann diskutiert werden, ob eine Größenabnahme während der Beladung Auswirkungen auf das Elutionsverhalten der DC

Beads® hat. Mit sinkendem Durchmesser vergrößert sich relativ die Oberfläche der Partikel und damit die für den Ionenaustausch der Elution verfügbare Fläche [87]. Inwieweit dies einer effektiven Medikamentenelution begünstigend entgegenwirkt müssen weitere Experimente zeigen. Sollte es zudem zu einer erneuten Größenzunahme der Partikel im Rahmen der Elution in vivo kommen, kann dies Auslöser erheblicher Schmerzen sein. Auch eine zusätzliche Größenänderung durch den Kontakt mit dem angiographisch verwendeten Kontrastmittel ist denkbar und bleibt Gegenstand zukünftiger Forschungen. In einem weiteren Experiment wird auf der Basis von Photometrie die Ladungskapazität der DC Beads® 300-500µm für Doxorubicin 2mg/ml untersucht. Nach erfolgreicher Beladung soll der Verlust von Doxorubicin an die umgebende Suspension und an das eingesetzte Kontrastmittel bei lediglich 0,2% liegen [93]. Die hier ermittelte Ladungskapazität entspräche somit der in vivo verfügbaren Medikamentendosis und liegt mit 18,375mg Doxorubicin pro 1 ml DC Beads® bei knapp der Hälfte des theoretischen Zielwertes von 37,5mg Doxorubicin /1 ml DC Beads®. Die vom Hersteller angegebene 98%ige Beladung innerhalb von 90 Minuten für Doxorubicin – Pulver 25mg/ml beziehungsweise 14 Stunden für Doxorubicin- Lösung 2mg/ml bezieht sich dabei möglicherweise auf die potentielle Aufnahmekapazität der DC Beads® und nicht auf die Reduktion der Zytostatika-Stammlösung. Es darf also auch nach erfolgreicher Beladung nicht unbedingt mit einer Zytostatikakonzentration von 37,5mg Doxorubicin /1 ml DC Beads® gerechnet werden. Für die praktische in vivo Anwendung ergibt sich somit die Frage, ob eine Ladungskapazität von 18,375mg Doxorubicin /1 ml DC Beads® selbst bei vollständiger Elution des Zytostatikums eine ausreichend therapeutische Wirksamkeit erreichen kann. Bekanntermaßen ist die Dynamik der Beladung abhängig von mehreren Faktoren. Beispielsweise ist die Beladungszeit von DC Beads® mit Doxorubicin abhängig von der Partikelgröße [17] und der Dosis des Zytostatikums [86]. Die hier erstellte Zeit-Dosis-Kurve für die Beladung der DC Beads® 300-500µm zeigt einen weitgehend homogenen Verlauf. Ein zeitlicher Vorhersagewert, wann bei diesem Experiment eine 98%ige Beladung der Partikel erreicht wäre, ist allerdings nicht möglich. Es handelt sich lediglich um eine Veranschaulichung der Medikamentenaufnahme in den ersten 20 Minuten der Beladung. Außerdem lässt sich kein Vergleich zu den vom Hersteller angegebenen Aufnahmezeiten der DEBDOX™ durchführen, da diese mit anderen Zytostatikakonzentrationen arbeiten. Bei der hier verwendeten Epirubicinkonzentration von 5mg/ml ist es als Schwachpunkt der Arbeit zu werten, dass die vorliegende Zeit-Dosis-Kurve lediglich über eine Dauer von 20 Minuten aufgezeichnet ist.

Die in vitro Erforschung der Elutionskinetik verschiedener Drug-Eluting Beads wird in dieser Arbeit mittels konstruierten Testsystemen bei Körpertemperatur durchgeführt. Die Testsysteme

stellten dabei offene oder geschlossene Kreisläufe dar, welche auf der Basis photometrischer Messungen abhängig von der Zeit Elutionswerte liefern. Bei der vergleichenden pharmakodynamischen Betrachtung der Elution von Doxorubicin-Lösung 2mg/ml und rekonstituiertem Doxorubicin-Pulver 25mg/ml aus DC Beads® im offenen Testsystem zeigen sich sehr ähnliche Kurvenverläufe. Die Kinetik der Medikamentenabgabe scheint also weitgehend unabhängig von der zur Beladung verwendeten Zytostatikakonzentration zu sein. Außerdem kann in diesem Experiment eine über Tage andauernde Elution nachgewiesen werden. Dieses Phänomen beschreibt auch Lewis et al. in einem in vitro Experiment für die DC Beads® 100-300µm. Demnach werden nach 24 Stunden der Elution lediglich 15% der verfügbaren Doxorubicinkonzentration freigesetzt und es dauert Tage bis Wochen, bis eine vollständige Elution stattgefunden hat [83]. Ähnliche Ergebnisse liefern in vivo Studien mit Doxorubicin beladenen DC Beads® im Schweinemodell. Dort wird Doxorubicin noch nach 90 Tagen im Gewebe nachgewiesen [94]. Nach den vorliegenden Ergebnissen scheint die maximale Doxorubicinabgabe nicht unmittelbar nach Applikation der Drug-Eluting Beads stattzufinden, sondern erst einige Stunden später. Auch die Arbeit von Choi et al. zeigt, dass im in vitro Elutionsprofil der DC Beads® die Doxorubicinabgabe in den ersten Stunden zunächst ansteigt bevor der Maximalwert erreicht ist [44]. Nach etwa 200 Stunden zeigen beide Elutionskurven auf dem Niveau geringer Messwerte keine gravierenden Änderungen mehr, sodass hier eine therapeutisch wirksame Konzentration des Zytostatikums diskutiert werden muss. In der Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit zur Beladungs- und Elutionsdynamik von DC Beads® ergibt sich ein weiterer Forschungsansatz für die Zukunft: Wäre es möglich, die DC Beads® mit der tatsächlichen Zielkonzentration von 37,5mg Doxorubicin/ 1 ml DC Beads® zu beladen, könnte möglicherweise eine längere Elutionsdauer therapeutisch wirksamer Konzentrationen erreicht werden. Dies hätte eine Verlängerung der Intervalle zwischen den TACE-Interventionen zur Folge und könnte ein patientenschonendes Vorgehen bedeuten. Aufgrund des experimentellen Charakters der Versuche lassen sich einige Abweichungen der Messwerte nicht vollständig vermeiden. So ist ein unerwartet hoher Messwert im Kurvenverlauf des Doxorubicin-Pulvers nach neun Stunden am ehesten auf eine versehentliche retrograde Wanderung der beladenen DC Beads® zurückzuführen. Die Elutionskurve der mit Doxorubicin- Lösung beladenen DC Beads® unterliegt in Stunde 22 einer Abweichung bedingt durch die Verlängerung der Messintervalle.

In einem geschlossenen Testkreislauf wird der pharmakodynamische Elutionscharakter von DC Beads® und Embozene Tandem™ verglichen. In diesem Experiment wird deutlich, dass die DC Beads® deutlich höhere Zytostatikakonzentrationen in der umgebenden Flüssigkeit

erreichen. Auch Gnutzmann et al. erforschen diese Thematik und zeigen in ihrem in vivo Experiment, dass die DC Beads® M1 (70-150µm) frühzeitig eine rasche Elution von Irinotecan aufweisen, wohingegen die Embozene Tandem™ (75µm) ein niedrigeres und langsames Elutionsprofil haben [95]. Da die DC Beads® M1 eine vergleichbare Größenordnung wie die Embozene Tandem™ aufweisen, kann in diesem Fall die Partikelgröße als entscheidender Einflussfaktor auf das Elutionsprofil nicht herangezogen werden. Bekannt ist, dass kleine Partikel die relative größere Oberfläche besitzen und damit sowohl die Beladung als auch die Elution schneller von statten geht [87]. Möglicherweise spielt dieses Phänomen eine Rolle bei der Bewertung unserer Ergebnisse. Immerhin ist die maximale Elution der Embozene Tandem™ (100µm) bereits nach etwa 18 Stunden und damit früher als bei den DC Beads® (300-500µm) erreicht, wenn auch auf deutlich niedrigerem Niveau der Messwerte. Ein Widerspruch ergibt hier zu den Aussagen von Blümmel et al.. Sie berichten über längere Elutionszeiten der Embozene Tandem™ gegenüber DEBDOX™. Für die Elution von 10mg Doxorubicin wird für die DEBDOX™ 100-300µm (37,5mg/ml Mikrosphären) eine Zeitspanne von 90 ± 20 Minuten angegeben, während die vergleichbare Zeitspanne der Embozene Tandem™ 100µm (50mg/ml Mikrosphären) bei 195 ± 25 Minuten liegen soll [88]. Außerdem fällt bei unseren Ergebnissen auf, dass lediglich die Embozene Tandem™ nach Erreichen ihres Maximalwertes eine sinkende Tendenz in ihrer Elutionskurve aufweisen. Das kann auf eine erneute Beladung der Drug- Eluting Beads hinweisen und führt im Verlauf zum Erreichen eines Gleichgewichtes. Voraussetzung für diese Annahme ist ein ausreichend großer Konzentrationsgradient, um eine erneute Beladung durch Ionenaustausch zu ermöglichen. Eine potentielle Wiederaufnahme des bereits eluierten Epirubicins als Ursache für dieses Phänomen wäre in der klinischen Anwendung der Embozene Tandem™ als kritisch zu bewerten und ginge wohl mit einer abnehmenden Wirksamkeit der Therapie einher. Es ist allerdings zu bedenken, dass es sich bei dem vorliegenden Experiment um ein geschlossenes Testsystem mit lediglich circa 500 ml Flüssigkeit handelt. Das in vivo befindliche Verteilungsvolumen ist deutlich höher, sodass sich ein derartiges Konzentrationsgefälle eher nicht aufbauen kann. Eine Abweichung des homogenen Kurvenverlaufs kommt in Stunde 139 durch eine erneute Leerwertbestimmung zustande. Dieser neue Referenzwert senkt den Verlauf beider Elutionskurven, ohne die Gesamttendenz zu beeinflussen. Im Weiteren ist zu bedenken, dass das hier vorliegende geschlossene Testsystem mit einer definierten Flüssigkeitsmenge betrieben wird und somit ein potentielles Erschöpfen verfügbarer Ionen als limitierender Faktor für die Elution nicht vollständig ausgeschlossen werden kann.

Auch das vergleichende Experiment der Elution von Mitoxantron aus DC Beads® und Embozene Tandem™ im offenen System liefert wichtige Erkenntnisse. Es wird deutlich, dass die DC Beads® über den gesamten Versuchsverlauf höhere Medikamentenkonzentrationen im Eluat erzielen als die Embozene Tandem™. Besonders ausgeprägt ist dieser Unterschied in den ersten Stunden nach Applikation. Daraus ergibt sich für die DC Beads® der Vorteil einer höheren Medikamentenkonzentration in der umgebenden Flüssigkeit und damit möglicherweise einer erhöhten antitumorösen Wirksamkeit. Die Embozene Tandem™ hingegen profitieren von einem homogenen Elutionsprofil ohne bedeutende Konzentrationsschwankungen im Verlauf. Dies bestätigt die Angaben des Herstellers der Embozene Tandem™, der mit einer kontrollierten Abgabe des Medikamentes wirbt. Ob die durch Elution aus den Embozene Tandem™ freigesetzte Zytostatikakonzentration jedoch ausreichend ist, um eine klinische Wirksamkeit in der Tumorthherapie zu erzielen, bleibt fraglich und muss in weiteren Experimenten getestet werden. Histologische Untersuchungen aus in vivo Experimenten zeigen zumindest, dass die TANDEM-IRI™ (Irinotecan loaded Embozene Tandem™) tief in den Tumor vordringen und Tumornekrosen auslösen [96]. Auch eine 2016 erschienene prospektive, randomisierte Studie über die Pharmakokinetik, Sicherheit und Effektivität von niedrig und hoch dosiert beladenen Embozene Tandem™ (33.3mg Doxorubicin / ml Beads und 50 mg Doxorubicin/ ml Beads) an Patienten mit HCC liefert vielversprechende Ergebnisse bezüglich des lokalen Tumorsprechens nach TACE mit Embozene Tandem™. Die in dieser Studie erzielten Überlebensraten betragen 98.08% nach 6 Monaten und 82.6% nach 3 Jahren, ohne statistischen Unterschied zwischen der niedrig und hoch dosierten Gruppe in Bezug auf das Gesamtüberleben [97]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zum Elutionsprofil der DC Beads® finden außerdem Anlehnung an die von Dreher et al. berichteten Erkenntnisse, wonach sich in den ersten Stunden nach Applikation deutlich erhöhte Medikamentenkonzentrationen im Gewebe messen lassen. Nach etwa 24 Stunden sind diese Werte bereits auf ein weitaus geringeres Niveau gefallen [86]. Doxorubicin kann noch nach 7 Tagen gemessen werden, wobei die Konzentration viel geringer ist [86]. Auch nach 14 Tagen ist Doxorubicin im Tumorgewebe vorhanden [98]. Untersuchungen am Schweinemodell besagen sogar den Nachweis von Doxorubicin nach über 3 Monaten [94]. Eine beständige Abgabe von zellzyklusspezifischen Zytostatika wie Doxorubicin über eine ausgedehnte Zeitspanne soll das Tumorsprechen verbessern [17]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kann es als Schwachpunkt gewertet werden, dass die Versuchsdauer lediglich 160 Stunden, also etwa eine Woche, beträgt. Außerdem ist zu beachten, dass Mitoxantron zwar die für den Ionenaustausch mit den Beads erforderliche positive Ladung im chemischen Gerüst besitzt, jedoch keine offizielle Zulassung für die Anwendung einer DEB-

TACE hat. Bei all unseren Versuchen zur Elutionsdynamik gilt es außerdem zu beachten, dass die DC Beads® und Embozene Tandem™ zu Versuchsbeginn theoretisch jeweils die gleiche Medikamentenkonzentration enthalten (37,5mg Epirubicin / 1 ml DC Beads® beziehungsweise 37,5mg Epirubicin/ 1 ml Embozene Tandem™ und 10mg Mitoxantron / 1ml DC Bead® beziehungsweise 10mg Mitoxantron / 1ml Embozene Tandem™). Im klinischen Alltag hingegen werden häufig verschiedene Konzentrationen verwendet, sodass dies einen weiteren möglichen Einflussfaktor auf das jeweilige Elutionsprofil darstellt. Zudem muss erwähnt werden, dass die aufgezeichneten Messwerte bei allen Experimenten zur Elutionskinetik Mittelwerte unterschiedlich langer Messintervalle darstellen und die in vitro Verhältnisse der vorliegenden Experimente nicht eins zu eins auf die in vivo Verhältnisse einer DEB-TACE übertragbar sind.

Zusammenfassend liefert diese Arbeit die Erkenntnis, dass sowohl im offenen als auch im geschlossenen Versuchsaufbau die DC Beads® höhere Medikamentenkonzentrationen im Eluat erreichen als die Embozene Tandem™. Das kann für Mitoxantron und Epirubicin eruiert werden und zwar jeweils über die gesamte Versuchsdauer hinweg. Besonders interessant ist diese Beobachtung vor dem Hintergrund, dass die DC Beads® bei ihrer Ladungskapazität möglicherweise unter den Herstellerangaben bleiben. Ob es ein vergleichbares Phänomen bei den Embozene Tandem™ gibt, muss in weiteren Versuchen zur deren Ladungskapazität erforscht werden und ist zu diesem Zeitpunkt unsicher. Das Elutionsprofil der DC Beads® scheint zumindest initial hohe und wirksame Zytostatikakonzentrationen zu erreichen. Um diese aufrecht zu erhalten, muss im klinischen Alltag die TACE mit DC Beads® zeitnah wiederholt werden. Alternativ gilt es Überlegungen anzustellen, welche die Behandlungsintervalle verlängern können, beispielsweise durch Erhöhung der Beladungsdosis. Im Hinblick auf die niedrigen in vitro Elutionswerte der Embozene Tandem™ drängt sich die Frage auf, ob die mit diesem palliativ eingesetzten Therapieregime behandelten Patienten eine hinreichend verbleibende Lebenszeit mitbringen, um überhaupt antitumorös wirksame Medikamentenkonzentrationen im Zielgebiet zu erreichen. Inwiefern bei Patienten mit fortgeschrittenen Malignomen die Indikation für eine TACE mit Embozene Tandem™ steht, ist unter Zusammenschau der Ergebnisse im Einzelfall individuell zu verhandeln. Aufgrund der langfristigen, homogenen Medikamentenabgabe ist jedoch die Verwendung von Embozene Tandem™ als Erhaltungstherapie vorstellbar, wobei auch hierfür höhere Konzentrationen im Eluat erstrebenswert sind. Dies könnte erreicht werden, wenn eine höhere Initialdosierung des Zytostatikums in den Embozene Tandem™ gelingt.

Trotz einiger Schwachpunkte der Experimente liefern die Versuche valide Hinweise auf das Vorhandensein essenzieller Unterschiede zwischen den DC Beads® und den Embozene Tandem™, welche durchaus klinische Bedeutung aufweisen können. Mit diesem Wissen ist es zu erwägen, ob eine weitere Differenzierung des Patientenkollektives einer DEB-TACE je nach verwendetem Drug- Eluting Beads und den damit verbundenen Eigenschaften sinnvoll und nötig ist.

6. Zusammenfassung

Die transarterielle Chemoembolisation wird vor allem bei Patienten mit HCC im mittleren Erkrankungsstadium therapeutisch eingesetzt.

Ziel dieser Arbeit ist es, mittels experimentellen in vitro Studien die physikalischen Charakteristika verschiedener partikulärer Embolisate sowie das pharmakodynamische Profil ausgewählter Drug- Eluting Beads zu analysieren.

Zur Testung der Elastizität werden die Embolisate vor, während und nach deren Passage durch einen eigens dafür hergestellten, gläsernen Simulationskatheter mit Innendurchmesser 0.014inch mikroskopiert. Die DC Beads® 300-500µm und Embozene Tandem™ 100µm werden während ihres Beladungsvorganges morphologisch dargestellt, für erstere wird zusätzlich Photometrie basiert deren Ladungskapazität sowie eine zeitabhängige Beladungsdynamik ermittelt. Die vergleichende Elutionskinetik von DC Beads® und Embozene Tandem™ wird in selbstkonstruierten offenen und geschlossenen in vitro-Testkreisläufen für die Zytostatika Doxorubicin, Epirubicin und Mitoxantron bei Körpertemperatur untersucht.

Bis zum Zieldurchmesser elastisch verformbar erweisen sich die Embosphere® Microspheres, Embozene™ Microspheres 400µm, Embozene™ Microspheres 500µm und die DC Beads® 300-500µm. Die Embozene™ Microspheres 1300µm zeigen nach der Katheterpassage irreversible Läsionen. Die EmboCept® 50-100µm und Embozene Tandem™ 100µm besitzen einen kleineren Durchmesser als der Testkatheter und können somit keiner Prüfung der Elastizität unterzogen werden. Bereits vor Katheterpassage weisen die Contour SE™ Microspheres irreguläre Oberflächenstrukturen auf. Im Beladungsvorgang zeigen sich die DC Beads® im Gegensatz zu den Embozene Tandem™ als größenstabil. Die ermittelte Zeit-Dosis-Kurve für die Beladung von Epirubicin in DC Beads® hat im beobachteten Zeitraum einen relativ homogenen Verlauf. Die ermittelte Ladungskapazität der DC Beads® für Doxorubicin bleibt unter dem theoretischen Zielwert. Das Elutionsprofil der DC Beads® stellt sich als weitgehend unabhängig von der initialen Beladungskonzentration des Doxorubicins dar. Verglichen mit den Embozene Tandem™ eluieren diese über die gesamte Versuchsdauer deutlich höhere Konzentrationen des jeweiligen Zytostatikums. In den offenen Testsystemen kann für beide Drug-Eluting Beads eine tagelange Elution nachgewiesen werden, wobei die Embozene Tandem™ ein homogeneres Elutionsprofil aufweisen. Die DC Beads® zeichnen

sich durch eine initial höhere Medikamentenabgabe in den ersten Stunden nach Applikation aus.

Die Ergebnisse zur Elastizität ergeben Fragen nach dem geeigneten Innendurchmesser des gewählten Katheters. Morphologische Änderungen der Partikel können Einfluss auf die Qualität der angiographischen in vivo Bildkontrolle und im Falle von Drug Eluting – Beads auf deren Elutionsprofil erwogen werden. Die Angaben der idealen Zytostatikakonzentration der DC Beads® von 37,5mg/ml sind kritisch zu hinterfragen. Bei den initial hohen Medikamentenkonzentrationen im Eluat der DC Beads® müssten zeitnah Behandlungswiederholungen erfolgen, um derartige Medikamentenspiegel aufrecht zu halten, wobei durch Steigerung der Ladungskapazität der DC Beads® eine Verlängerung die Interventionsintervalle denkbar ist. Könnten die niedrigen Elutionswerte der Embozene Tandem™ durch Erhöhung der initialen Beladungsdosis gesteigert werden, können diese aufgrund ihres homogenen Elutionsprofils als Erhaltungstherapie diskutiert werden. In Zusammenschau ist zu erwägen, ob eine Differenzierung des Patientenkollektives einer DEB-TACE je nach pharmakodynamischem Profil der verwendeten Drug- Eluting Beads sinnvoll ist.

7. Abkürzungsverzeichnis

BCLC *Barcelona Clinic Liver Cancer*
CCC *Cholangiocellular carcinoma*
CRC *Colorectal cancer*
cTACE *konventionelle TACE*
CTCAE *Common Terminology Criteria for Adverse Events, Common Terminology Criteria for Adverse Events*
CW *Clockwise*
DEBIRI *Irinotecan loaded Drug Eluting Beads*
DEB-TACE *Drug Eluting Bead- TACE*
EASL *European Association for the Study of the Liver*
ECOG *Eastern Cooperative Oncology Group*
HAI *Hepatic Artery Infusion*
HCC *Hepatocellular carcinoma*
HCL *Chlorwasserstoff*
min *Minuten, Minuten*
nm *Nanometer*
PVA *Polyvinylalkohol*
RCT *Randomized Controlled Trial*
RFA *Radiofrequenzablation*
TAC *Transarterielle Chemotherapie*
TACE *Transarterielle Chemoembolisation*
TAE *Transarterielle Embolisation*
TANDEM- IRI *Irinotecan loaded Embozene Tandem*
UCSF *University of California, San Francisco*

8. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: PORTALVENÖSE EMBOLISATION DES RECHTEN LEBERLAPPENS. KLINIKUM GROßHADERN, 2012	8
ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER TACE [20]	10
ABBILDUNG 3: DOXORUBICINLEVEL IM SERUM ZU VERSCHIEDENEN ZEITPUNKTEN BEI DER DEB-TACE (A) UND DER CTACE(B) [24]	12
ABBILDUNG 4: COMPLETE RESPONSE, OBJECTIVE RESPONSE AND DISEASE CONTROL RATE (CUMULATIVE NUMBER [%] OF PATIENTS) ALLER PATIENTEN NACH 6 MONATEN. [1].....	14
ABBILDUNG 5: BCLC SYSTEM. HCC: HEPATOCELLULAR CARCINOMA, PS: PERFORMANCE STATUS, TACE: TRANSARTERIELLE CHEMOEMBOLISATION. [61]	16
ABBILDUNG 6: SIMULATIONS KATHETERSPITZE MIT DURCHMESSER 0.014 INCH, ABGEMESSEN AN SYNCHRO ² STANDARD 0.014 IN X 200CM	21
ABBILDUNG 7: DRAHT (EV 3 TM NITREX TM .018 '' X 80CM) MIT DER REFERENZGERADE DER LÄNGE 460µM	23
ABBILDUNG 8: REFERENZWERT DES MAßSTABES MIT ERWEITERUNG AUF GELÄUFIGE LÄNGEN.....	23
ABBILDUNG 9: EMBOCEPT [®] S 45MMG/7,5ML DEGRADABLE STARCH MICROSPHERES (PHARMACEPT)	25
ABBILDUNG 10: WEICHWEIZENGRIEß(AVIKO B.V., NIEDERLANDE)	25
ABBILDUNG 11: CONTOUR SE TM MICROSPHERES, 300-500µM (BOSTON SCIENTIFIC COORPORATION)	26
ABBILDUNG 12: EMBOSPHERE [®] MICROSPHERES 700-900µM (MERIT MEDICAL)	26
ABBILDUNG 13: EMBOZENE TM MICROSPHERES 400µM (CELO [®] NOVA BIOSCIENCES, INC.)	27
ABBILDUNG 14: EMBOZENE TM MICROSPHERES 500µM (CELO [®] NOVA BIOSCIENCES, INC.)	27
ABBILDUNG 15: EMBOZENE TM MICROSPHERES 1300µM (CELO [®] NOVA BIOSCIENCES, INC.)	28
ABBILDUNG 16: DC BEADS [®] 300-500µM (TERUMO, BIOCOMPATIBLES)	28
ABBILDUNG 17: EMBOZENE TANDEM TM 100µM (CELO [®] NOVA BIOSCIENCES, INC.)	29
ABBILDUNG 18: VERFAHREN ZUR FÄRBUNG VON EMBOCEPT [®] MIT KÖNGISBLAUER TINTE	30
ABBILDUNG 19: PVA-GRUNDGERÜST DER DC BEADS [®] MIT REAKTIVEN GRUPPEN (ROT) [79], MODIFIZIERT.....	32
ABBILDUNG 20: ZYTOSTATIKA MIT REAKTIVEN GRUPPEN (ROT) [80-82], MODIFIZIERT	32
ABBILDUNG 21: LOADING INSTRUCTIONS DER DC BEADS [®] MIT DOXORUBICIN- PULVER (TERUMO, BIOCOMPATIBLES)	34
ABBILDUNG 22: DURCHLICHT- PHOTOMETER	38
ABBILDUNG 23: LOADING GUIDANCE DER EMBOZENE TANDEM TM (CELO [®] NOVA BIOSCIENCES, INC.)	42
ABBILDUNG 24: SCHEMATISCHER VERSUCHSAUFBAU DER ELUTION VON DOXORUBICIN-LÖSUNG 2MG/ML UND REKONSTITUIERTEM DOXORUBICIN 25MG/ML AUS DC BEADS [®] 300-500µM IM OFFENEN SYSTEMS	48
ABBILDUNG 25: SCHEMATISCHER VERSUCHSAUFBAU DER ELUTION VON EPIRUBICIN 25MG/ML AUS DC BEADS [®] 300-50µM UND EMBOZENE TANDEM TM 100µM IM GESCHLOSSENEN SYSTEM.....	53
ABBILDUNG 26: SCHEMATISCHER VERSUCHSAUFBAU DER ELUTION VON MITOXANTRON 2MG/ML AUS DC BEADS [®] 300-500µM UND EMBOZENE TANDEM TM 100µM IM OFFENEN SYSTEM	56
ABBILDUNG 27: EMBOCEPT [®] MICROSPHERES (PHARMACEPT) VOR, WÄHREND UND NACH DER KATHETERPASSAGE (HIER BLAU GEFÄRBT).....	58
ABBILDUNG 28: WEICHWEIZENGRIEß (FELDMÜHLE) VOR, WÄHREND UND NACH DER KATHETERPASSAGE	59
ABBILDUNG 29: CONTOUR SE TM MICROSPHERES 300-500µM (BOSTON SCIENTIFIC CORPORATION) VOR, WÄHREND UND NACH DER KATHETERPASSAGE	60
ABBILDUNG 30: EMBOSPHERE [®] MICROSPHERES 700-900µM (MERIT MEDICAL) VOR, WÄHREND UND NACH DER KATHETERPASSAGE	60
ABBILDUNG 31: EMBOZENE TM MICROSPHERES 400µM (CELO [®] NOVA BIOSCIENCES, INC.) VOR, WÄHREND UND NACH DER KATHETERPASSAGE	61
ABBILDUNG 32: :EMBOZENE TM MICROSPHERES 500µM (CELO [®] NOVA BIOSCIENCES, INC.) VOR, WÄHREND UND NACH DER KATHETERPASSAGE	62
ABBILDUNG 33: EMBOZENE TM MICROSPHERES 1300µM (CELO [®] NOVA BIOSCIENCES, INC.) VOR, WÄHREND UND NACH DER KATHETERPASSAGE	62
ABBILDUNG 34: DC BEADS [®] 300-500µM (TERUMO, BIOCOMPATIBLES) VOR, WÄHREND UND NACH DER KATHETERPASSAGE	63
ABBILDUNG 35: EMBOZENE TANDEM TM 100µM, (CELO [®] NOVA BIOSCIENCES, INC.) VOR, WÄHREND UND NACH DER KATHETERPASSAGE	63

ABBILDUNG 36: LINKS: DC BEADS® NATIV, RECHTS: DC BEADS® BELADEN MIT DOXORUBICIN 2MG/ML	64
ABBILDUNG 37: ZEIT-DOSIS – KURVE FÜR DIE BELADUNG VON DC BEADS®300- 500µM MIT EPIRUBICIN 5MG/ML	66
ABBILDUNG 38: LINKS: EMBOZONE TANDEM™ NATIV, RECHTS: EMBOZONE TANDEM™ BELADEN MIT EPIRUBICIN25MG/ML	69
ABBILDUNG 39: LINKS: EMBOZONE TANDEM™ 15MIN NACH ERSTKONTAKT MIT EPIRUBICIN 25MG/ML, RECHTS: EMBOZONE TANDEM 60 MIN NACH ERSTKONTAKT MIT EPIRUBICIN 25MG/ML.....	70
ABBILDUNG 40: ELUTIONSKURVE FÜR DC BEADS® IM OFFENEN SYSTEM.....	73
ABBILDUNG 41: ELUTIONSKURVE FÜR DC BEADS® UND EMBOZONE TANDEM™ IM GESCHLOSSENEN SYSTEM.....	77
ABBILDUNG 42: ELUTIONSKURVEN FÜR DC BEADS® UND EMBOZONE TANDEM™ IM OFFENEN SYSTEM.....	80

9. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: LOADING TIMES DER DC BEADS® FÜR DOXORUBICIN- LÖSUNG (TERUMO, BIOCOMPATIBLES)	35
TABELLE 2: LOADING TIMES DER DC BEADS® MIT DOXORUBICIN-PULVER (TERUMO, BIOCOMPATIBLES)	36
TABELLE 3: LOADING TIMES DER DC BEADS® FÜR DOXORUBICIN-LÖSUNG (TERUMO, BIOCOMPATIBLES)	37
TABELLE 4: DRUG LOADING TIME DER EMBOZONE TANDEM™ (CELO®NOVA BIOSCIENCES, INC)	43
TABELLE 5: ZEITABHÄNGIGE EXTINKTIONSWERTE DER MESSFLÜSSIGKEIT WÄHREND DER BELADUNG VON DC BEADS® MIT EPIRUBICIN 5MG/ML	65
TABELLE 6: EXTINKTIONEN DER MESSFLÜSSIGKEITEN BEI DER ELUTION VON DOXORUBICIN- LÖSUNG 2MG/ML UND REKONSTITUIERTEM DOXORUBICIN 25MG/ML AUS DC BEADS® 300-500µM IM OFFENEN SYSTEM.....	72
TABELLE 7: ELUTIONSWERTE DER MESSFLÜSSIGKEITEN BEI DER ELUTION VON EPIRUBICIN 25MG/ML AUS DC BEADS® 300-500µM UND EMBOZONE TANDEM™ 100µM IM GESCHLOSSENEN SYSTEM.....	76
TABELLE 8: ELUTIONSWERTE DER MESSFLÜSSIGKEITEN BEI DER ELUTION VON MITOXANTRON 2MG/ML AUS DC BEADS® 300-500M UND EMBOZONE TANDEM™ 100µM IM OFFENEN SYSTEM.....	79

10. Literaturverzeichnis

1. Lammer, J., et al., *Prospective randomized study of doxorubicin-eluting-bead embolization in the treatment of hepatocellular carcinoma: results of the PRECISION V study*. Cardiovasc Intervent Radiol, 2010. **33**(1): p. 41-52.
2. Schafermeyer, R., *Pediatric trauma*. Emerg Med Clin North Am, 1993. **11**(1): p. 187-205.
3. Raikhlin, A., et al., *Imaging and transcatheter arterial embolization for traumatic splenic injuries: review of the literature*. Can J Surg, 2008. **51**(6): p. 464-72.
4. Tsang, L.L., et al., *Microcoils embolization of splenic artery pseudoaneurysm complicated with chronic pancreatitis*. Hepatogastroenterology, 2002. **49**(45): p. 842-3.
5. Siablis, D., et al., *Splenic arteriovenous fistula and sudden onset of portal hypertension as complications of a ruptured splenic artery aneurysm: Successful treatment with transcatheter arterial embolization. A case study and review of the literature*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(26): p. 4264-6.
6. Benson, D.A., Z.T. Stockinger, and N.E. McSwain, Jr., *Embolization of an acute renal arteriovenous fistula following a stab wound: case report and review of the literature*. Am Surg, 2005. **71**(1): p. 62-5.
7. Dinkel, H.P., H. Danuser, and J. Triller, *Blunt renal trauma: minimally invasive management with microcatheter embolization experience in nine patients*. Radiology, 2002. **223**(3): p. 723-30.
8. Maxwell, N.J., et al., *Renal artery embolisation in the palliative treatment of renal carcinoma*. Br J Radiol, 2007. **80**(950): p. 96-102.
9. Kuo, W.T., et al., *Superselective microcoil embolization for the treatment of lower gastrointestinal hemorrhage*. J Vasc Interv Radiol, 2003. **14**(12): p. 1503-9.
10. Wang, H.H., et al., *Interventional therapy for acute hemorrhage in gastrointestinal tract*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(1): p. 134-6.
11. Monnin, V., et al., *Place of arterial embolization in severe blunt hepatic trauma: a multidisciplinary approach*. Cardiovasc Intervent Radiol, 2008. **31**(5): p. 875-82.
12. Pelage, J.P., et al., *Limited uterine artery embolization with tris-acryl gelatin microspheres for uterine fibroids*. J Vasc Interv Radiol, 2003. **14**(1): p. 15-20.
13. Radeleff, B., et al., *Transarterial embolization of primary and secondary tumors of the skeletal system*. Eur J Radiol, 2006. **58**(1): p. 68-75.
14. Nakanishi, K., et al., *Transarterial embolization (TAE) of sacral giant cell Tumor (GCT) using spherical permanent embolic material superabsorbant polymer microsphere (SAP-MS)*. Springerplus, 2013. **2**: p. 666.
15. Baltacioglu, F., et al., *Transarterial microcatheter glue embolization of the bronchial artery for life-threatening hemoptysis: technical and clinical results*. Eur J Radiol, 2010. **73**(2): p. 380-4.
16. Ryttefors, M., et al., *International subarachnoid aneurysm trial of neurosurgical clipping versus endovascular coiling subgroup analysis of 278 elderly patients*. Stroke, 2008. **39**(10): p. 2720-2726.
17. Kramer, I., *Drug-eluting beads: a pharmaceutical assessment*. Hospital Pharmacy Europe, 2007: p. 35-36.
18. Wang, Y.X., et al., *Transcatheter embolization therapy in liver cancer: an update of clinical evidences*. Chin J Cancer Res, 2015. **27**(2): p. 96-121.
19. Hecq, J.D., et al., *Doxorubicin-loaded drug-eluting beads (DC Bead(R)) for use in transarterial chemoembolization: a stability assessment*. J Oncol Pharm Pract, 2013. **19**(1): p. 65-74.
20. Lewis, A.L. and M.R. Dreher, *Locoregional drug delivery using image-guided intra-arterial drug eluting bead therapy*. J Control Release, 2012. **161**(2): p. 338-50.
21. Lencioni, R., *Loco-regional treatment of hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2010. **52**(2): p. 762-73.

22. Namur, J., et al., *Embolization of hepatocellular carcinoma with drug-eluting beads: doxorubicin tissue concentration and distribution in patient liver explants*. J Hepatol, 2011. **55**(6): p. 1332-8.
23. Paul, S.B. and H. Sharma, *Role of Transcatheter Intra-arterial Therapies for Hepatocellular Carcinoma*. J Clin Exp Hepatol, 2014. **4**(Suppl 3): p. S112-21.
24. Varela, M., et al., *Chemoembolization of hepatocellular carcinoma with drug eluting beads: efficacy and doxorubicin pharmacokinetics*. J Hepatol, 2007. **46**(3): p. 474-81.
25. Lewandowski, R.J., et al., *Transcatheter intraarterial therapies: rationale and overview*. Radiology, 2011. **259**(3): p. 641-57.
26. Ebert, M., J. Ebert, and G. Berger, *Intravital microscopic research of microembolization with degradable starch microspheres*. J Drug Deliv, 2013. **2013**: p. 242060.
27. Buijs, M., et al., *Nonresectable hepatocellular carcinoma: long-term toxicity in patients treated with transarterial chemoembolization--single-center experience*. Radiology, 2008. **249**(1): p. 346-54.
28. Lo, C.M., et al., *Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2002. **35**(5): p. 1164-71.
29. Llovet, J.M., et al., *Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial*. Lancet, 2002. **359**(9319): p. 1734-9.
30. Llovet, J.M. and J. Bruix, *Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival*. Hepatology, 2003. **37**(2): p. 429-42.
31. Camma, C., et al., *Transarterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma: meta-analysis of randomized controlled trials*. Radiology, 2002. **224**(1): p. 47-54.
32. Brown, K.T., et al., *Randomized Trial of Hepatic Artery Embolization for Hepatocellular Carcinoma Using Doxorubicin-Eluting Microspheres Compared With Embolization With Microspheres Alone*. J Clin Oncol, 2016. **34**(17): p. 2046-53.
33. Morse, M.A., et al., *Improved time to progression for transarterial chemoembolization compared with transarterial embolization for patients with unresectable hepatocellular carcinoma*. Clin Colorectal Cancer, 2012. **11**(3): p. 185-90.
34. Lewis, A.L., et al., *Pharmacokinetic and safety study of doxorubicin-eluting beads in a porcine model of hepatic arterial embolization*. J Vasc Interv Radiol, 2006. **17**(8): p. 1335-43.
35. Liapi, E. and J.F. Geschwind, *Transcatheter arterial chemoembolization for liver cancer: is it time to distinguish conventional from drug-eluting chemoembolization?* Cardiovasc Intervent Radiol, 2011. **34**(1): p. 37-49.
36. Woo, H.Y. and J. Heo, *Transarterial chemoembolization using drug eluting beads for the treatment of hepatocellular carcinoma: Now and future*. Clin Mol Hepatol, 2015. **21**(4): p. 344-8.
37. Kloeckner, R., et al., *Conventional transarterial chemoembolization versus drug-eluting bead transarterial chemoembolization for the treatment of hepatocellular carcinoma*. BMC Cancer, 2015. **15**: p. 465.
38. Chen, P., et al., *Evaluation of drug-eluting beads versus conventional transcatheter arterial chemoembolization in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis*. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2016. **41**(1): p. 75-85.
39. Facciorusso, A., et al., *Drug-eluting beads versus conventional chemoembolization for the treatment of unresectable hepatocellular carcinoma*. Journal of gastroenterology and hepatology, 2016. **31**(3): p. 645-653.
40. Arabi, M., et al., *Doxorubicin-loaded drug-eluting beads versus conventional transarterial chemoembolization for nonresectable hepatocellular carcinoma*. Saudi J Gastroenterol, 2015. **21**(3): p. 175-80.
41. Guiu, B., et al., *Liver/biliary injuries following chemoembolisation of endocrine tumours and hepatocellular carcinoma: lipiodol vs. drug-eluting beads*. J Hepatol, 2012. **56**(3): p. 609-17.

42. Golfieri, R., et al., *Randomised controlled trial of doxorubicin-eluting beads vs conventional chemoembolisation for hepatocellular carcinoma*. Br J Cancer, 2014. **111**(2): p. 255-64.
43. Orsi, F. and G. Varano, *Minimal invasive treatments for liver malignancies*. Ultrason Sonochem, 2015. **27**: p. 659-67.
44. Choi, J.W., et al., *Comparison of drug release and pharmacokinetics after transarterial chemoembolization using diverse lipiodol emulsions and drug-eluting beads*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e115898.
45. Rostambeigi, N., E. Cressman, and J. Golzarian, *Classic TACE Versus Drug-Eluting Beads. Lipiodol or drug-eluting beads in the treatment of hepatocellular carcinoma? An old question revisited*. Endovascular Today, 2012.
46. Aliberti, C., et al., *Hepatic Arterial Infusion of Polyethylene Glycol Drug-eluting Beads for Primary and Metastatic Liver Cancer Therapy*. Anticancer Res, 2016. **36**(7): p. 3515-21.
47. Solomon, S.B. and C.T. Sofocleous, *The interventional radiologist role in treating liver metastases for colorectal cancer*. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2012: p. 202-4.
48. Pox, C., et al., *S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom Version 1.0–Juni 2013 AWMF-Registernummer: 021/007OL*. Zeitschrift für Gastroenterologie, 2013. **51**(08): p. 753-854.
49. Arnold, D. and A. Stein, *Kolorektales Karzinom: Innovationen bei den multimodalen Therapien*, in *Deutsches Ärzteblatt*. 2014. p. 12.
50. Rauchfuß, F. and U. Settmacher, *Intraarterielle und systemische Applikation der Chemotherapie bei irresektablen Lebermetastasen kolorektaler Karzinome*. Chirurg, 2015. **86**(5): p. 497.
51. Akinwande, O., C. Scoggins, and R.C. Martin, *Early Experience with 70-150 µm Irinotecan Drug-eluting Beads (M1-DEBIRI) for the Treatment of Unresectable Hepatic Colorectal Metastases*. Anticancer Research, 2016. **36**(7): p. 3413-3418.
52. Vogl, T.J., et al., *Transarterial chemoembolization (TACE) with mitomycin C and gemcitabine for liver metastases in breast cancer*. Eur Radiol, 2010. **20**(1): p. 173-80.
53. de Baere, T., et al., *Transarterial chemoembolization of liver metastases from well differentiated gastroenteropancreatic endocrine tumors with doxorubicin-eluting beads: preliminary results*. J Vasc Interv Radiol, 2008. **19**(6): p. 855-61.
54. Greten, T., et al., *Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms*. Zeitschrift für Gastroenterologie, 2013. **51**(11): p. 1269-1326.
55. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. Int J Cancer, 2010. **127**(12): p. 2893-917.
56. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.
57. Idee, J.M. and B. Guiu, *Use of Lipiodol as a drug-delivery system for transcatheter arterial chemoembolization of hepatocellular carcinoma: a review*. Crit Rev Oncol Hematol, 2013. **88**(3): p. 530-49.
58. Ioannou, G.N., et al., *Incidence and predictors of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2007. **5**(8): p. 938-45, 945.e1-4.
59. Llovet, J.M., A. Burroughs, and J. Bruix, *Hepatocellular carcinoma*. Lancet, 2003. **362**(9399): p. 1907-17.
60. Bruix, J. and M. Sherman, *Management of hepatocellular carcinoma: an update*. Hepatology, 2011. **53**(3): p. 1020-2.
61. Adhoute, X., et al., *Usefulness of staging systems and prognostic scores for hepatocellular carcinoma treatments*. World J Hepatol, 2016. **8**(17): p. 703-15.
62. Liver, E.A.F.T.S.O.T., *EASL–EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma*. Journal of Hepatology, 2012. **56**(4): p. 908-943.
63. de Lope, C.R., et al., *Management of HCC*. J Hepatol, 2012. **56 Suppl 1**: p. S75-87.
64. Kalva, S.P., et al., *Transarterial chemoembolization with Doxorubicin-eluting microspheres for inoperable hepatocellular carcinoma*. Gastrointest Cancer Res, 2011. **4**(1): p. 2-8.
65. Bruix, J. and M. Sherman, *Management of hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2005. **42**(5): p. 1208-36.

66. Shah, R.P., K.T. Brown, and C.T. Sofocleous, *Arterially directed therapies for hepatocellular carcinoma*. *AJR Am J Roentgenol*, 2011. **197**(4): p. W590-602.
67. Wiggermann, P., et al., *Transarterial Chemoembolization of Child-A hepatocellular carcinoma: drug-eluting bead TACE (DEB TACE) vs. TACE with cisplatin/lipiodol (cTACE)*. *Med Sci Monit*, 2011. **17**(4): p. Cr189-95.
68. Facciorusso, A., et al., *Transarterial chemoembolization: Evidences from the literature and applications in hepatocellular carcinoma patients*. *World J Hepatol*, 2015. **7**(16): p. 2009-19.
69. Sieghart, W., et al., *The ART of decision making: retreatment with transarterial chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma*. *Hepatology*, 2013. **57**(6): p. 2261-73.
70. Petersen, J., et al., *Transarterielle perkutane Chemoembolisation beim Leberzellkarzinom*. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 2013. **163**(5-6): p. 123-127.
71. Kalva, S.P., et al., *Safety and effectiveness of chemoembolization with drug-eluting beads for advanced-stage hepatocellular carcinoma*. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 2014. **37**(2): p. 381-7.
72. Graziadei, I.W., et al., *Chemoembolization followed by liver transplantation for hepatocellular carcinoma impedes tumor progression while on the waiting list and leads to excellent outcome*. *Liver Transpl*, 2003. **9**(6): p. 557-63.
73. Yu, C.Y., et al., *Drug-Eluting Bead Transarterial Chemoembolization as Bridge Therapy for Hepatocellular Carcinoma Before Living-Donor Liver Transplantation*. *Transplant Proc*, 2016. **48**(4): p. 1045-8.
74. Yin, L., et al., *Partial hepatectomy vs. transcatheter arterial chemoembolization for resectable multiple hepatocellular carcinoma beyond Milan Criteria: a RCT*. *J Hepatol*, 2014. **61**(1): p. 82-8.
75. Padia, S.A., et al., *Outcomes of Locoregional Tumor Therapy for Patients with Hepatocellular Carcinoma and Transjugular Intrahepatic Portosystemic Shunts*. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 2015. **38**(4): p. 913-21.
76. Lewis, A.L., et al., *Doxorubicin eluting beads - 1: effects of drug loading on bead characteristics and drug distribution*. *J Mater Sci Mater Med*, 2007. **18**(9): p. 1691-9.
77. Lewis, A.L., *DC Bead- Some Fundamental Insights into Product Performance*, in *ECIO - European Conference on Interventional Oncology*. 2013.
78. Lewis, A.L., *DC Bead: a major development in the toolbox for the interventional oncologist*. *Expert Rev Med Devices*, 2009. **6**(4): p. 389-400.
79. Kaiser, J., *Neue Untersuchungen zum Verordnungsmonitoring sowie zur Kompatibilität und Stabilität applikationsfertiger Zytostatika-Zubereitungen*. 2011.
80. Seite „Doxorubicin“. In: *Wikipedia, Die freie Enzyklopädie*. Bearbeitungsstand: 8. Januar 2017, 21:30 UTC. URL: <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Doxorubicin&oldid=161438372> (Abgerufen: 26. März 2017, 11:13 UTC).
81. Seite „Epirubicin“. In: *Wikipedia, D.f.E.B.D.*, 19:44 UTC. URL: <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Epirubicin&oldid=160462864> (Abgerufen: 26. März 2017, 11:20 UTC).
82. Seite „Mitoxantron“. In: *Wikipedia, D.f.E.B.N.*, 23:28 UTC. URL: <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Mitoxantron&oldid=160239765> (Abgerufen: 26. März 2017, 11:20 UTC).
83. Lewis, A.L., et al., *DC bead: in vitro characterization of a drug-delivery device for transarterial chemoembolization*. *J Vasc Interv Radiol*, 2006. **17**(2 Pt 1): p. 335-42.
84. Marelli, L., et al., *Transarterial therapy for hepatocellular carcinoma: which technique is more effective? A systematic review of cohort and randomized studies*. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 2007. **30**(1): p. 6-25.
85. Raza, A. and G.K. Sood, *Hepatocellular carcinoma review: current treatment, and evidence-based medicine*. *World J Gastroenterol*, 2014. **20**(15): p. 4115-27.

86. Dreher, M.R., et al., *Radiopaque drug-eluting beads for transcatheter embolotherapy: experimental study of drug penetration and coverage in swine*. J Vasc Interv Radiol, 2012. **23**(2): p. 257-64.e4.
87. Liu, D.M., et al., *A review of conventional and drug-eluting chemoembolization in the treatment of colorectal liver metastases: principles and proof*. Future Oncol, 2015. **11**(9): p. 1421-8.
88. Blümmel, J., et al., *Drug-eluting beads in the treatment of hepatocellular carcinoma and colorectal cancer metastases to the liver*. European oncology & haematology, 2012. **8**(3): p. 162-166.
89. Lee, K.H., et al., *Distribution of iron oxide-containing Embosphere particles after transcatheter arterial embolization in an animal model of liver cancer: evaluation with MR imaging and implication for therapy*. J Vasc Interv Radiol, 2008. **19**(10): p. 1490-6.
90. Tsochatzis, E.A., et al., *Transarterial therapies for hepatocellular carcinoma (HCC): a long way towards standardization*. J Hepatol, 2013. **58**(1): p. 194.
91. Martin, R., et al., *Optimal technique and response of doxorubicin beads in hepatocellular cancer: bead size and dose*. Korean J Hepatol, 2011. **17**(1): p. 51-60.
92. Padia, S.A., et al., *Safety and efficacy of drug-eluting bead chemoembolization for hepatocellular carcinoma: comparison of small-versus medium-size particles*. J Vasc Interv Radiol, 2013. **24**(3): p. 301-6.
93. Malagari, K., *Drug-eluting particles in the treatment of HCC: chemoembolization with doxorubicin-loaded DC Bead*. Expert Rev Anticancer Ther, 2008. **8**(10): p. 1643-50.
94. Namur, J., et al., *Drug-eluting beads for liver embolization: concentration of doxorubicin in tissue and in beads in a pig model*. J Vasc Interv Radiol, 2010. **21**(2): p. 259-67.
95. Gnutzmann, D.M., et al., *Evaluation of the plasmatic and parenchymal elution kinetics of two different irinotecan-loaded drug-eluting embolics in a pig model*. J Vasc Interv Radiol, 2015. **26**(5): p. 746-54.
96. Tanaka, T., et al., *Pharmacokinetics and antitumor efficacy of chemoembolization using 40 microm irinotecan-loaded microspheres in a rabbit liver tumor model*. J Vasc Interv Radiol, 2014. **25**(7): p. 1037-1044.e2.
97. Malagari, K., et al., *Pharmacokinetics, Safety, and Efficacy of Chemoembolization with Doxorubicin-Loaded Tightly Calibrated Small Microspheres in Patients with Hepatocellular Carcinoma*. Cardiovasc Intervent Radiol, 2016. **39**(10): p. 1379-91.
98. Hong, K., et al., *New intra-arterial drug delivery system for the treatment of liver cancer: preclinical assessment in a rabbit model of liver cancer*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(8): p. 2563-7.

11. Eidesstattliche Versicherung

Barnikel, Michaela

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Experimentelle in vitro Analyse physikalischer Charakteristika von Drug-Eluting Beads sowie deren Beladungs- und Elutionskinetik

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 01.03.2018

Barnikel, Michaela

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Herzlich danken möchte ich Herrn Professor Reiser für die freundliche Überlassung des wissenschaftlichen Themas sowie die Möglichkeit zur Anfertigung meiner Promotionsarbeit.